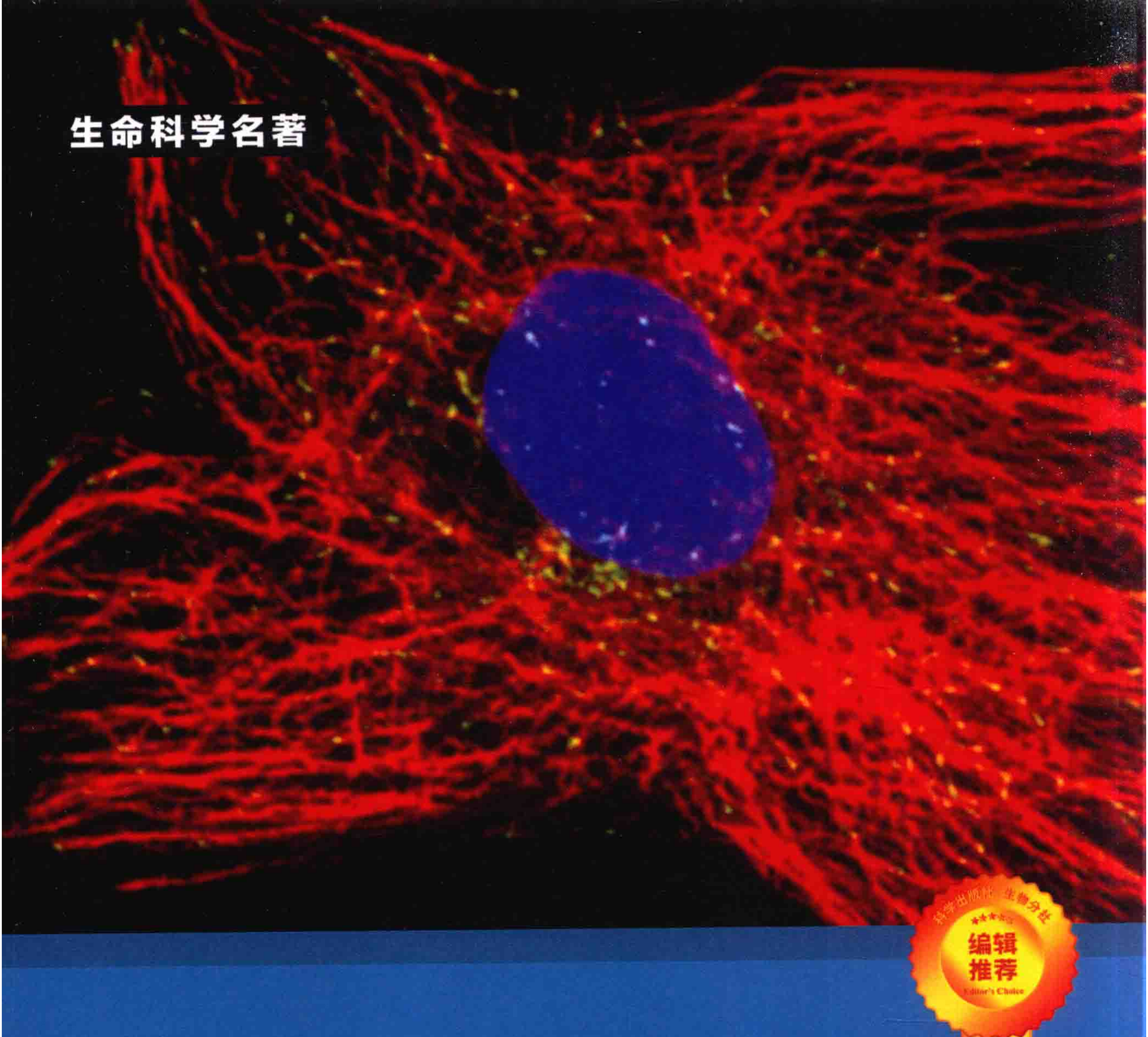


生命科学名著

科学出版社 生物分社

编辑推荐

Editor's Choice

细胞

Cells

〔美〕 B. 卢因
L. 卡西梅里斯
V. R. 林加帕
G. 普洛泊 编著

桑建利 连慕兰 等 译

科学出版社

(Q-2293.31)



生命科学名著·典藏版

呈现国际学术精华，引进国际经典名著

细胞生物学精要（原书第三版）
分子生物学（原书第五版）
基因的分子生物学（原书第七版）
Brock微生物生物学（上下册）
遗传学：基因和基因组分析（第八版）
细菌分子遗传学（原书第五版）
神经生物学：从神经元到脑（原书第5版）
人类分子遗传学
衰老分子生物学
发育的原理（影印版）
糖生物学概述（原书第三版）
结构生物学：从原子到生命
Brock微生物生物学（影印）（原书第十版）
生物化学--基础理论与临床（原书第六版）
细胞生理学手册——膜生物物理学精要（下册）（原书第四版）
细胞生理学手册——膜生物物理学精要（上册）（原书第四版）
植物生物学
表观遗传学
蛋白质物理
进化
细胞
藻类学
基因组3
森林遗传学
基因组学概论
癌生物学
Lewin 基因X
糖生物学基础
微生物基因组
兽医微生物学



科学出版中心　生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com



赛拉艾芙
生命科学订阅号

本书彩图及更多
信息请扫码

www.sciencep.com



定价（全套）：4500.00 元

销售分类建议：生物学

生命科学名著·典藏版

细　　胞

CELLS

〔美〕 B. 卢因
L. 卡西梅里斯
V. R. 林加帕
G. 普洛珀
编著

桑建利　连慕兰 等　译

科学出版社

图字：01-2007-1134 号

内 容 简 介

本系列丛书均选择生命科学领域经久不衰的经典名著，作者均为国际一流专家，堪称各个专业领域的国际第一书。每一本书的更新都紧跟学科发展，更加适合当前的学习和研究。

本丛书包括《癌生物学》、《分子生物学》、《神经生物学：从神经元到脑》、《表观遗传学》、《基因的分子生物学（第七版）》、《细胞生物学精要（原书第三版）》、《结构生物学：从原子到生命》等 30 本经典著作。

Original English Language Edition Published by Jones and Bartlett Publishers, Inc. 40 Tall Pine Drive Sudbury, MA 01776

图书在版编目（CIP）数据

生命科学名著：典藏版/（美）温伯格（Weinberg, R. A.）等编著；詹启敏等译. —北京：科学出版社，2016
ISBN 978-7-03-047485-8

Ⅰ.①生… Ⅱ.①温…②詹… Ⅲ. ①生命科学–研究 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043879 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科 学 出 版 社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第一次印刷 印张：1431 3/4
字数：33 950 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

前　言

《细胞》是一本主要为高年级本科生和研究生初次学习细胞生物学课程而编写的新的细胞生物学教科书，也可作为科学工作者更多了解本领域之外知识的参考书。编写本书的主要目的是展示多年积累的研究成果，给学生们提供信息，使他们在细胞生物学方面打下牢固的基础，不至于因太多的知识细节而举步维艰。本书聚焦于细胞生物学，所有编写人员、主编、科学顾问以及编辑们力求在本书中涵盖本领域的最新进展和各个方面的内容，提供细胞在分子水平上活动的丰富图解，同时又不显得太繁琐。

本书重点包括真核细胞的结构、组织、生长、调节、运动以及细胞间的相互作用。这些主题将在全书7篇17章中进行论述。首先是细胞的定义，其次是细胞的成分和细胞功能的调节，最后是细胞的多样性。植物细胞和原核细胞将在单独的章节中论述，本书在强调这种多元化的同时还突出了所有细胞的共性。

每一章都由一名或几名本学科的专家撰写。这些科学家们提供的资料由顾问组审阅，顾问组提出一些必要的意见。主编和科学编辑共同努力在整体上全面细致地把握本书，使文中和图表中术语的使用及论述的水平保持一致。

《细胞》的设计旨在加强教学。每章都会分成几个部分，每部分都有强调要点的标题。每部分以一系列主要概念开始，可以帮助读者一开始就抓住中心思想。为了激发学生们对将来工作的兴趣，每章都会有一个称为“展望”的部分，涉及一些研究人员正在攻关的有趣课题。本书为那些对实验感兴趣的学生列出了主要综述和研究论文，有助于他们对每个问题的理解。

美术人员与作者和编辑合作，绘制出尽可能简单易懂的插图，这使读者从图中可以阅读和理解图表标题和正文框架。标注的显微图片和分子结构有助于学生认识细胞组分以及理解结构和功能间的关联。所绘制的图尽可能根据分子的相对大小。原理图尽量描述到分子水平。颜色和基于原子结构的分子形状在整本书中采用统一的表示方式。

本书的电子版放在了网站 http://bioscience.jbpub.com/cells 上，提供本书参考的相关资源，书中以MBIO：1-0001之类的符号表示。例如，学生们可以在此网站参考有关实验技术的其他信息，或其他专业书籍的内容，如 Benjamin Lewin 编写的 *Genes*。网站还包含交互式图片、动画、视频，这种可视化手段对于理解细胞动态的本质是很重要的。这些网上图像在书中图注的左边用符号标注。交互式图片包括带有标注的显微图片的打开、关闭，原子结构图像的旋转，它们分别有助于认识细胞和分子的关键特征。此外，网络上的生化章节为没有完成或希望温习相关课程的读者提供了背景资料。指导者工具包包括了《细胞》中所有图片的幻灯片，所有动画、视频、大量试题以及基于主要概念的讲座概要。

我们感激所有为本书提供必要显微图片和其他图像的科学家，以及允许复制这些图

片的期刊和图书出版商。这些感谢将在图注中列出。关于我们从 RSCB 蛋白质资料库采集的原子结构图像，其原始来源专门用一页列出。

我们欢迎提出修改建议和批评意见，敬请发送至 info@jbpub.com。

桑建利　译

致　谢

感谢在本书编写过程中许多以非正式方式给予建议的科学家；Kent Matlack，他对细胞生物学体系的掌握和缜密编排，以及对本书编写的清晰思路，使其成为这个团队中无可替代的一员；Leslie Roldan 和 Linda Ko Ferrigno，对正文写作和编辑做出了重要贡献；Ruth Rose，一位天才的艺术家，在本书的艺术加工方面给予了很大帮助；还有以下建言者，他们阅读了正文部分章节并提出了许多宝贵意见：

Stephen Adam	Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, IL
Tobias Baskin	University of Massachusetts, Amherst
Harris Bernstein	National Institutes of Health, Bethesda, MD
Fred Chang	Columbia University, New York, NY
Louis DeFelice	Vanderbilt University, Nashville, TN
Paola Deprez	Institute of Microbiology-ETH, Zurich, Switzerland
Arshad Desai	University of California, San Diego
Paul De Weer	University of Pennsylvania, Philadelphia
Biff Forbush	Yale University, New Haven, CT
Joseph Gall	Carnegie Institution, Baltimore, MD
Emily Gillett	Harvard Medical School, Boston, MA
Rebecca Heald	University of California, Berkeley
Alistair Hetherington	Bristol University, United Kingdom
Harald Herrmann	German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany
Philip Hinds	Tufts-New England Medical Center, Boston, MA
Jer-Yuan Hsu	University of California, San Diego
Martin Humphries	University of Manchester, United Kingdom
James Kadonaga	University of California, San Diego
Randall King	Harvard Medical School, Boston, MA
Roberto Kolter	Harvard Medical School, Boston, MA
Susan LaFlamme	Albany Medical Center, NY
Rudolf Leube	Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany
Vivek Malhotra	University of California, San Diego
Frank McCormick	University of California, San Francisco
Akira Nagafuchi	Kumamoto University, Japan
Roel Nusse	Stanford University, Palo Alto, CA
Andrew Osborne	Harvard Medical School, Boston, MA
Erin O'Shea	Harvard University, Cambridge, MA
Marcus Peter	University of Chicago, Chicago, IL
Suzanne Pfeffer	Stanford University, Stanford, CA
Tom Rapoport	Harvard Medical School, Boston, MA
Ulrich Rodeck	Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA
Michael Roth	University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas
Lucy Shapiro	Stanford University, Stanford, CA
Thomas Shea	University of Massachusetts, Lowell
David Siderovski	University of North Carolina, Chapel Hill
Mark Solomon	Yale University, New Haven, CT
Chris Staiger	Purdue University, West Lafayette, IN
Margaret A. Titus	University of Minnesota, Minneapolis
Livingston Van De Water	Albany Medical Center, NY
Miguel Vicente-Manzanares	University of Virginia, Charlottesville
Patrick Viollier	Case Western Reserve University, Cleveland, OH
Claire Walczak	Indiana University, Bloomington
Junying Yuan	Harvard Medical School, Boston, MA
Sally Zigmond	University of Pennsylvania, Philadelphia

桑建利　译

编写人员

编著者/作者

Benjamin Lewin 在 1974 年创立了 *Cell* 杂志并担任主编直到 1999 年。他还创立了 *Cell* 杂志子刊——*Neuron*，*Immunity* 和 *Molecular Cell*。2000 年，他创立了 Virtual Text，并于 2005 年被 Jones and Bartlett 出版公司收购。他是 *Genes* 和 *Essentials Genes* 的作者。

Lynne Cassimeris 是 Lehigh 大学生物科学学系的教授，Lehigh 大学位于宾夕法尼亚州的 Bethlehem。她研究微管组装动力学和有丝分裂。

Vishwanath R. Lingappa 是 CPMC 研究院 Bioconformatics 实验室的资深科学家，Prosetta 公司的首席技术官，以及 California 大学生理学名誉教授。他的研究方向是蛋白质的生物起源。他作为一名志愿医生在旧金山总医院从事内科医学工作，并参与合著了生理学和病理生理学教科书。

George Plopper 是 Rensselaer Polytechnic 研究所的副教授。他研究信号转导和胞外基质结合诱导的细胞行为。

作者

Michael Caparon 是 Washington 大学医学院分子微生物系的副教授。他实验室的研究方向是研究感染时病原性革兰氏阳性菌与其人类宿主间发生的复杂相互作用。

Matt Chapman 是 Michigan 大学的副教授。他的实验室研究细菌淀粉状蛋白纤维的功能和生物起源。

Melanie H. Cobb 是 Texas 大学西南医学中心药理学系的教授，讲授细胞调控与生物化学研究生课程。她的团队以 MAPK 通路和 WNK 为重点，研究蛋白质激酶的调控和功能。

Charles Cole 是 Dartmouth 医学院生物化学和遗传学的教授。他的兴趣包括细胞核运输、细胞转化与无限增殖的调控、RNA 代谢、小 RNA 和乳腺癌。

Enrique M. De La Cruz 是 Yale 大学分子生物物理和生物化学系的副教授。他的实验室利用生物化学和生物物理技术研究基于肌动蛋白和肌球蛋白的运动机制。他的工作还关注 RNA 解旋酶的马达特性。

Jeff Errington 是英国 Newcastle 大学细胞和分子生物科学研究所的主任。他致力于细胞周期和细菌形态发生的研究。

Susan Forsburg 是 Southern California 大学分子与计算生物学专业的教授。她的实验室研究芽殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 的 DNA 复制和基因组动态学。

Kathleen Gould 是 Vanderbilt 大学医学院细胞与发育生物学专业的教授，而且还是 Howard Hughes 医学研究会的研究员。她的实验室致力于胞质分裂的机制和调控研究。

Douglas R. Green 是 St. Jude 儿童研究医院的免疫学教授。他的实验室研究细胞凋亡以及相关的细胞死亡过程。

Scott Hultgren 是 Washington 大学医学院分子微生物专业教授。他的主要兴趣在于阐明细菌致病的基本机制。他的实验室也正在研究被称为 curli 的类淀粉状蛋白纤维，由大肠杆菌产生。

Birgit Lane 是新加坡分子医学中心主任，以及苏格兰 Dundee 大学解剖学和细胞生物学教授，学科带头人。她研究中间纤维，特别是角蛋白，在人类疾病中发挥的作用。

Stephan E. Lehnart 是 Columbia 大学生理学和细胞生物物理系 Clyde and Helen Wu 分子心脏病学研究中心的研究员和副教授。他的主要研究兴趣是心脏和骨骼肌中调节胞内钙离子循环，以及对疾病发生至关重要的膜转运机制。

Clive Lloyd 是英国 Norwich 区 John Innes 中心的项目规划领导。他研究细胞骨架在植物生长和发育中的作用。

Andrew R. Marks 是 Clyde and Helen Wu 分子心脏病学研究中心的教授，Columbia 大学生理学和细胞生物物理系的教授和主任。他致力于肌肉和非肌肉系统中大分子信号复合体调节离子通道功能的研究。他是美国科学院医学研究所、美国艺术与科学院以及美国科学院的成员。

Ira Mellman 是 Yale 大学医学院细胞生物学系的权威和主任，*Cell Biology* 杂志的主编。他的实验室长期从事阐明内吞途径的膜转运基本机制，特别是它与树突细胞对抗原的加工与呈递以及上皮细胞膜极化区域的产生有关。

E. Michael Ostap 是 Pennsylvania 大学医学院的副教授，Pennsylvania 肌肉研究所的成员。他的实验室利用细胞生物学、生物化学和生物物理学技术研究细胞运动的机制。近期他的工作集中于反常的肌球蛋白研究。

Conly Rieder 是 Wadsworth 中心细胞调控实验室的高级研究员和负责人。Wadsworth 中心是隶属于纽约州卫生部的一个高水平研究机构。他还是 New York 州立大学生物医学科学系的教授。Rieder 博士已经致力于细胞分裂研究 30 多年。

Elliott M. Ross 是 Texas 大学西南医学中心药理学系教授，讲授分子生物物理学和细胞调控的研究生课程。他的团队研究 G 蛋白信号网络的信息处理。

Tom Rutkowski 是 Michigan 大学医学中心 Howard Hughes 医学研究会的博士后助理。他研究在发育和疾病中针对蛋白质错误折叠胁迫的细胞适应性应答。

Pamela Silver 是 Harvard 医学院系统生物学专业的教授。她的兴趣包括细胞核运输、基因组构成、RNA 动力学以及合成生物学。

Srinivas Venkatram 是 Pacific 大学生物科学专业的副教授，Kathy Gould 实验室 HHMI（Howard Hughes 医学研究会）的前助理研究员。当前他的研究兴趣是了解细胞周期调控的微管组织中心及微管的组装和去组装。

Graham Warren 是 Yale 医学院细胞生物学专业的教授。他的实验室研究高尔基体的结构、功能和生物起源。

Robert A. Weinberg 是麻省理工学院 Daniel K. Ludwig 癌症研究中心和美国癌症协会教授，Whitehead 生物医学研究所的创建者之一。他的研究关注控制细胞增殖和肿瘤形成的分子机制。

桑建利　译

缩 写 词

A	腺嘌呤或腺苷
ADP	二磷酸腺苷
AMP	腺苷酸
cAMP	环磷酸腺苷
ATP	三磷酸腺苷
ATPase	ATP 酶
bp	碱基对
C	胞苷或胞嘧啶
cDNA	互补 DNA
CDP	二磷酸胞苷
CMP	胞苷酸
CTP	三磷酸胞苷
DNA	脱氧核糖核酸
DNAase	脱氧核糖核酸酶
G	鸟嘌呤或鸟苷
GDP	二磷酸鸟苷
GlcNAc	*N*-乙酰葡糖胺
GMP	鸟苷酸
GTP	三磷酸鸟苷
ΔG	自由能
kb	千碱基或千碱基对
Mb	百万碱基或百万碱基对
mRNA	信使 RNA
MW	分子质量
Pi	无机磷酸盐
PPi	无机焦磷酸盐
RNA	核糖核酸
RNAase	RNA 酶
rRNA	核糖体 RNA
tRNA	转移 RNA
T	胸腺嘧啶或胸苷
U	尿嘧啶
UDP	二磷酸尿苷
UMP	尿苷酸
UTP	三磷酸尿苷

前缀

(缩写词)	**数量级**
百万（M）	10^6
千（k）	10^3
十分之一（d）	10^{-1}
百分之一（c）	10^{-2}
千分之一（m）	10^{-3}
百万分之一（μ）	10^{-6}
十亿分之一（n）	10^{-9}
兆分之一（p）	10^{-12}

单位

Å	埃
Da	道尔顿
g	克
h	小时
M	摩尔浓度
m	米
min	分钟
N	牛顿
S	斯维德贝格单位
s 或 sec	秒
V	伏特

氨基酸

A	Ala	丙氨酸
C	Cys	半胱氨酸
D	Asp	天冬氨酸
E	Glu	谷氨酸
F	Phe	苯丙氨酸
G	Gly	甘氨酸
H	His	组氨酸

I	Ile	异亮氨酸
K	Lys	赖氨酸
L	Leu	亮氨酸
M	Met	甲硫氨酸
N	Asn	天冬酰胺
P	Pro	脯氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
R	Arg	精氨酸
S	Ser	丝氨酸
T	Thr	苏氨酸
V	Val	缬氨酸
W	Trp	色氨酸
Y	Tyr	酪氨酸

简　　目

第1篇　导　　论

第2篇　膜及运输机制

第3篇　细　胞　核

第4篇　细 胞 骨 架

第5篇　细胞分裂、凋亡与癌症

第6篇　细 胞 通 讯

第 7 篇　原核及植物细胞

目　　录

第 1 篇　导　论

第 2 篇　膜及运输机制

第 1 篇　导　　论

第 1 章　什么是细胞?



第1章　什么是细胞?

Benjamin Lewin

Founding Publisher/Editor，Cell Press and Virtual Text；Author of *Genes*

本章概要

1.1　导言

关键概念

- 细胞只能从既有的细胞中产生。
- 每个细胞都有遗传信息，依靠遗传信息的表达产生自身的各种成分。
- 质膜由磷脂双分子层构成，将细胞和环境分隔开来。

有机体广泛的多样性是基于一种单一的基本建筑构件——细胞。正如19世纪细胞理论所认识到的，生物学的基本原则是细胞只能通过现有细胞的分裂产生。

最简单的有机体是单细胞的：细胞自身就是一个有机体，作为一个能够繁殖、增加自身拷贝的单个实体存在。单细胞生物能适应多种不同环境下的生活，从极冷到极热，生活在需氧或厌氧条件下，甚至在充满甲烷的环境中。有些还能在其他生物体内生存。

细胞也能组成多细胞生物，细胞特化成具有不同功能的各种细胞。多细胞生物的细胞之间彼此交流，使生物体作为一个整体行使功能。生物体具有繁殖的能力，尽管其中单独的细胞能或者不能增殖。有机体内不应该增殖的细胞获得了无限增殖的能力就可能导致癌症。

细胞在形状和大小上差异巨大，如图 1.1 所示。最小的细胞是单细胞生物，是直径不大于 0.2μm 的球体。最大的细胞之一是巨大乌贼的神经元，直径 1mm，是前者的 5000 倍。从神经元胞体延伸出来的轴突直径 20μm，比最小的细胞宽 100 倍，并可能长达 10cm。人类（和其他哺乳动物）的细胞直径在 3～20μm 之间，位于这些极端的中间。

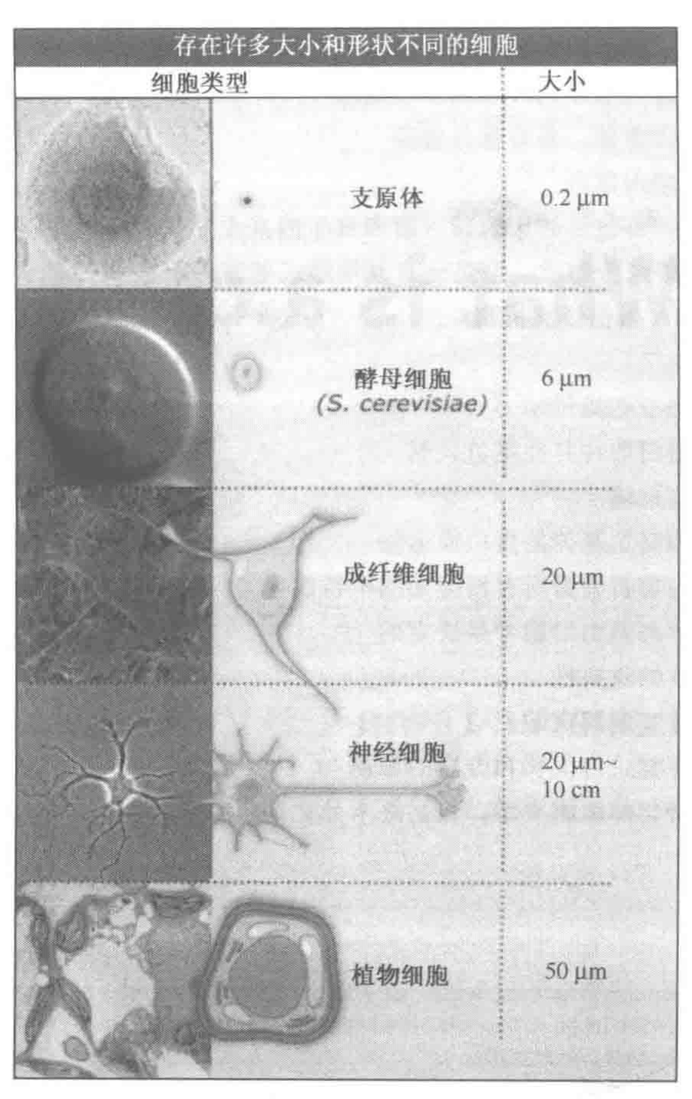


图 1.1　细胞在大小和形状上变化很大。一些细胞是球状，一些细胞具有很长的突起或延伸，延伸之间还有很多变化。照片：支原体，获得 Ulm 大学 Tim Pietzcker 的许可；酵母，获得 Harvard 医学院 Fred Winston 的许可；成纤维细胞，获得 Ehime 大学医学院 Junzo Desaki 的许可；神经细胞，获得 Innsbruck 医学院 Gerald J. Obermair 和 Bernhard E. Flucher 的许可；植物细胞，获得 Alberta 大学 Ming H. Chen 的许可。

一个细胞可能形状变化很小，只形成一个简单的球体在液体环境中生存，也可能有非常确定的结构，如神经元带有延伸的轴突，或者像上皮细胞那样有明确的具有不同功能的顶端面（apical surface）和基底外侧面（basolateral surface）。细胞可以自由地生活在溶液中，也可能附着到其他细胞上。细胞可以彼此交流也可能彼此攻击。

尽管细胞有呈现如此不同形态的能力，所有细胞的结构还是以几项共同的特征为基础：

- 有一层膜叫做**质膜（plasma membrane）**，将细胞内部和外界环境分隔开。
- 质膜包含控制物质进出细胞的系统。
- 细胞的组分都来源于食物，通过内部能量转换系统构建出来。
- 遗传物质包含着产生细胞所有组分的信息。
- 基因表达使细胞能利用自身的遗传信息。
- 各种蛋白质产物是由基因编码、合成后组装成的大型结构。

细胞是由磷脂双分子层构成的膜包围的。图 1.2 总结了磷脂双分子层的独特性质。它是由脂质形成的大分子结构。脂质的主要特点在于它的两性：一端是亲水的“头部”，另一端是疏水的“尾部”。“磷脂双分子层”的每一“页”（leaf）都有一侧由亲水头部组成，另一侧由疏水尾部组成。多水环境导致疏水尾部聚集在一起，因此每一“页”的疏水端结合在一起形成一个非离子中心，很像油滴在水里的状况。而两“页”的亲水头部面向磷脂双分子层两侧的离子环境（ionic milieu）。磷脂双分子层具有重要的流动特性，使得膜之间的融合以及分裂时新膜的产生成为可能，也为蛋白质驻留以及在脂双层中移动提供了条件。

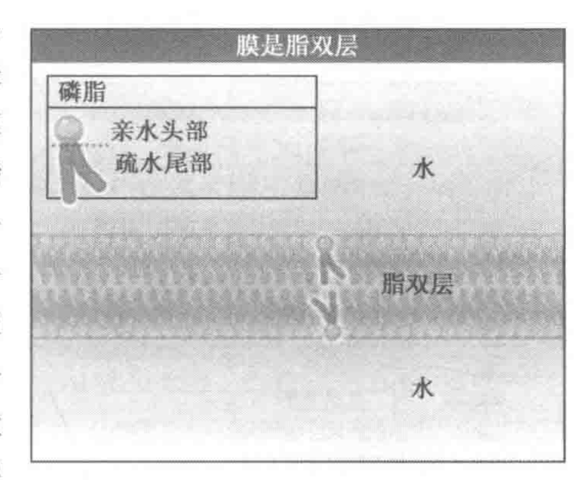


图 1.2　膜的脂双层最初只包含两亲性磷脂。

脂双层是某种可透过水，不可透过离子、小的带电分子和所有大分子的膜。膜两侧离子环境的差异造成了渗透压（osmotic pressure）——这是一种状态，此时水跨过膜移动来稀释浓度更高的那一侧的离子浓度。

细胞质膜将细胞组分和外界环境分隔开来。对于一个单细胞生物来说，“外部环境”就是“外部世界”；而对于一个多细胞生物来说，生物体外的外部世界还有生物体内其他细胞（如血管细胞）创造的内部环境共同构成了“外部环境”。质膜没有结构强度，事实上，它是相当脆弱易碎的。因此，细胞的完整通常需要细胞膜下其他更有张力的结构进行支持。

活细胞中的很多过程都是由酶催化的，这些酶的结合常数和其他的调节点（set point）支配着对与生命共存的内外环境中大、小分子的浓度变化的耐受量。然而，有机体能调整自己来适应一个广泛的环境，生活在极端条件下的生物都含有一些特殊的酶，在普通生物致死的情况下这些酶仍能发挥作用。

细胞需要调控它的内环境使得自己的系统正常地运转。特别要控制离子水平和 pH。而膜的不透过性则使细胞需要一个位于膜中的特殊系统来控制离子进出。

细胞必须从外界输入物质，特别要输入能源物质（这是新陈代谢的基础）和作为细胞成分前体物的小分子，这些成分装配成大分子和结构。脂肪酸用来合成脂类，氨基酸用来合成蛋白质，而核酸用来合成 DNA 和 RNA。

正如所有的细胞必须从外界输入原料，因此也必须能够排出物质。细胞排出多种离子、小分子甚至蛋白质。显然，输入和输出都是非常特异的过程：只允许应该进或出的物质以一种高度选择性的方式进出。

为了生存和自我更新，细胞必须能从环境中获取能量，利用能量来合成自身的组分。能量的来源可以是从环境中摄取的物质，最典型的是简单的和复杂的含碳化合物的混合物。光也能作为能量的来源。不同的细胞类型，利用能量的方式也不尽相同。

由于新细胞的产生需要原先存在的细胞发生分裂，一个细胞内必须携有复制它所有组分的信息。这种信息的形式是一种单一类型的遗传物质——DNA，能够编码细胞中所有的蛋白质。蛋白质转而组装成大的结构或负责催化细胞中的内部反应。在所有的细胞中，用于转译基因密码的装置有着相同类型的组成。由于细胞不断地处于外界环境的侵害之下，要长期存活，一种修复遗传信息损伤的方法是必不可少的。



图 1.3 一个细胞含有能编码自己所有结构的一套基因组，一种表达基因信息的方法，一套利用能量的系统和一个控制与外部世界交流的质膜。

细胞通过自我分裂达到永生。一种特殊的装置给予细胞自我分裂产生两个子细胞的能力，每个子细胞包含和母细胞等量的遗传物质和大约一半的细胞其他结构。（一些例外情况见 1.22 分化产生了特化的细胞类型，包括终末分化细胞）

图 1.3 总结了组成一个细胞所需的最小特征。概括地说，细胞膜将细胞与外界环境隔开，因此所有活细胞与环境相互作用都要遵从细胞膜的固有性质。构建细胞还需要利用能量将小的“建筑材料”变成更复杂的成分。遗传物质带有复制细胞所有特征所必需的信息，所有的细胞都有一个系统来利用这一信息。

1.2 生命始于一种自我复制的构造

关键概念

- 最初的活细胞是一种被膜包围的自我复制实体。

我们认为，当某种自我复制的结构与环境隔离的时候生命就开始了。这一点对于保护自身不受外界事物伤害以及避免在原始汤（primeval soup）中浓度被无限稀释都是十分必要的。近年来的研究表明最初的自我复制结构可能是基于核糖核苷酸（ribonucleotide），因此我们可以设想某种原始 RNA 由保护性膜包被产生了最初的生命体。我们

把这种生命体叫做原生质团（protoplasmic blob）。

RNA 要求能够以装配核苷酸前体的方式进行自我复制。我们尚不知道有什么其他的催化反应参与其中，不过它们最可能与提供复制前体的代谢反应有关。

在早期，自我复制体和包围它的膜之间一定存在某种耦联关系。一项能帮助细胞形成的反应就是 RNA 帮助膜的延伸。最近的一些工作提供了一个可能的答案来解释这样一种联系的本质。当 RNA 被质膜包围时，RNA 的带电基团产生渗透压。这就在膜中造成了一种张力，通过扩大膜表面积能对此进行缓解，也就是说，须向膜中并入更多脂分子。在核苷酸和膜之间的这种物理相互作用可能是使原生质团聚集的最初力量。

对于水状溶质的不可透过性是细胞膜的基本生物学性质。然而，原生质团必须有物质的进出移动，否则会发生内部资源的枯竭。也许，和外部世界的一些物质交换可以通过膜上的零星孔洞进行，这些孔洞使得膜短暂地不稳定。正如图 1.4 提到的那样，最初所谓“膜”的作用可能只是将自我复制的结构与外部分开，可能还未格外地区分出外界和内部环境。

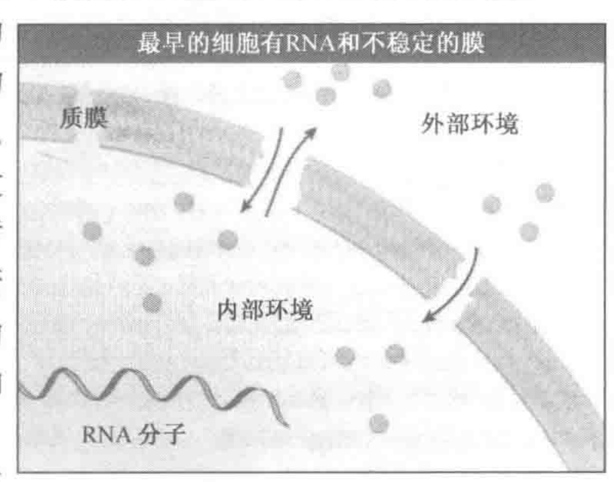


图 1.4　最早的自我复制细胞实体有一个自我复制的 RNA 和围绕它的膜。

将这种系统的最初不受控制的内外交流转换为能在内部保持与外界不同状态的系统，是原生质团向我们能称作原始细胞（primitive cell）的转变中一项重大的进展，正如图 1.5 中总结的那样。这已经通过膜中最初系统的进化完成，这个系统允许细胞成分的前体物输入，并输出不需要的产物。

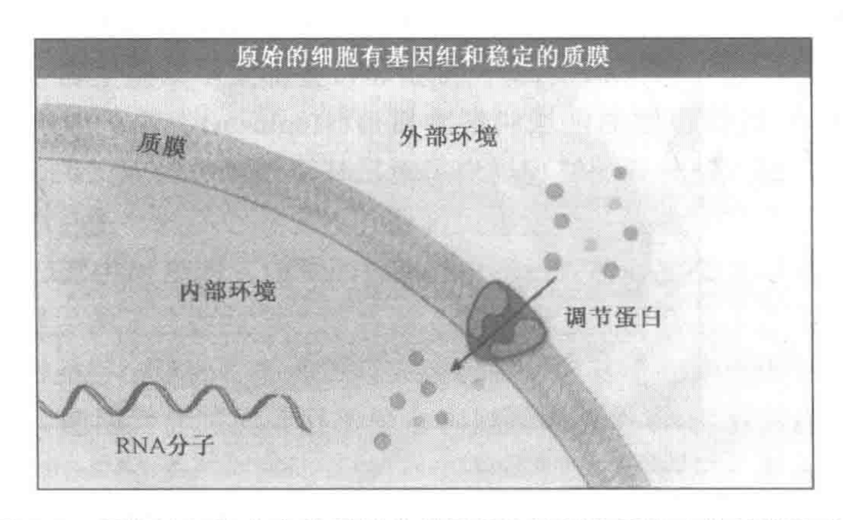


图 1.5　原始的细胞由自我复制的基因组和控制物质进出的质膜构成。

细胞还需要什么特征才能称为一个细胞呢？这种自我复制的实体不仅仅需要自我复制，还需要直接或间接地决定它的环境的性质，包括包围它的膜。这就需要新陈代谢系统来将环境中输入的前体物质转变为细胞需要的分子，并组装成一定的结构。细胞需要一个系统来利用能源并以某种形式储存能量，这种形式的能量能被细胞利用来有力地驱

动非自发的反应。

现代细胞的遗传物质不能进行自我复制，而被限制为一种编码功能，这样就要求有特殊的复制和表达机构。相对于 RNA 而言，利用蛋白质的好处在于其催化活性更高，形式更为广泛。现在我们可以相当容易地知道遗传物质是怎样从自我复制的 RNA 转变为 DNA，而 DNA 又复制和转录成 RNA 的，但是很难理解它是怎样转变成通过遗传密码去编码蛋白质的。然而，由于所有的细胞有着相同的密码，我们知道这种基因表达系统的发生一定出现在进化中相当早的阶段。这种系统普遍的特征是：遗传物质都是 DNA，而 RNA 在基因表达过程中扮演三种不同的角色：信使 RNA、转运 RNA 以及蛋白质合成机器核糖体中的结构成分。

1.3 原核细胞由一个单独的隔室组成

关键概念

- 原核细胞的质膜围成了细胞隔室（compartment）。
- 整个隔室有相同的水状环境（aqueous environment）。
- 遗传物质在细胞内占据一个紧密的区域。
- 细菌和古菌都是原核生物，但是结构特征存在差异。

根据内部分隔方式的不同，所有的生活细胞能被大致地分为两类。一个“隔室”（compartment）被简要地定义为膜包围的一个区域（volume）：

- **原核细胞（prokaryote）**只有单一隔室，内含遗传物质、基因表达体系以及基因表达产物。隔室由膜包围，内部不含其他隔室。
- **真核细胞（eukaryote）**至少含有 2 个隔室，整个细胞由细胞质膜包围；内部还另有一个隔室含有遗传物质。

原核细胞可以分为两类。最初所有的原核生物都被看作是细菌（bacteria），但是现在我们认为其中一些是古菌（archaea）。细菌和古菌都是单细胞生物（尽管一些细菌会呈群落聚集现象）。质膜包围的区域叫**细胞质（cytoplasm）**。原核细胞的质膜被**细胞壁（cell wall）**包围，细胞壁坚硬的结构提供了对抗环境侵害的物理保护。图 1.6 显示遗传物质在细菌的单一隔室中占据一个紧密的区域，但是并没有膜将遗传物质与其他成分隔开。最简单的细菌形式是支原体（mycoplasma），它们不能自由生活，因为它们不能制造生命所需的许多基本化合物，它们只能生活在能生产这些分子的生物体内。它们的基因组很小，只含有不到 500 个基因，编码组成细胞所需要的最小特征性结构。自由生活的细菌基因组含有超过 1500 个基因，编码小分子代谢所需的代谢酶，还编码更加复杂的基因表达调控系统（见MBIO：1-0001）。

细菌可以被分为两大类，大约在 20 亿年前就出现了这样的分化。根据是否对革兰氏染色（Gram stain）发生反应，分别叫做革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌。*Escherichia coli* 是最典型的革兰氏阴性细菌，*Bacillus subtilis* 是最典型的革兰氏阳性细菌。革兰氏敏感性取决于染料和细胞壁之间的相互作用。革兰氏阳性菌的细胞壁包围细胞膜，染料直接和细胞壁组分相互作用。革兰氏阴性菌在细胞壁外还有一层膜。这层膜的存在以及细胞壁成分的不同阻止了染色反应发生。内膜和外膜之间的区域叫做壁膜间隙

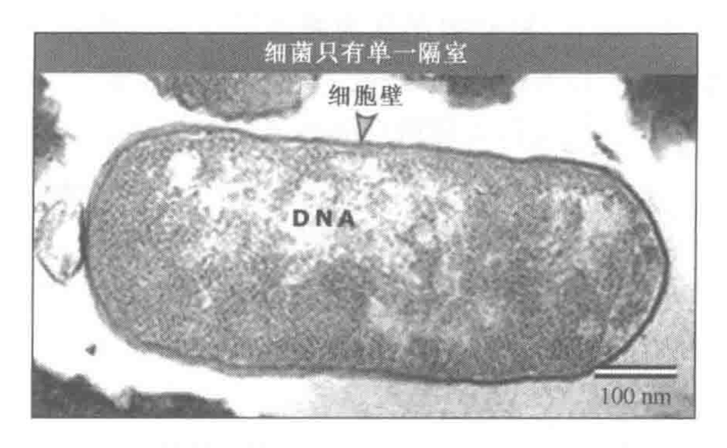


图 1.6　细菌只有单一隔室，尽管可以辨认出内部的不同区域。照片获得麻省理工学院 Jonathan King 的许可。

(periplasmic space)，内含自己特征性的蛋白质群和其他组分。根据隔室是由膜包围的空间这个标准，我们可以说革兰氏阴性菌是有双隔室的，但壁膜间隙只与菌体和环境的相互作用有关，合成反应发生在包含遗传物质的同一个内部隔室中，这一基本事实并未改变。

细菌的细胞质是单一的多水环境，这就意味着所有的酶都在相同的离子条件下工作。然而，细菌远远不止是一个“装酶的口袋”，现在很清楚，很多蛋白质都靶向到特定的亚细胞位置或结构上。一些细菌能够经过发展变化形成特化的细胞类型，使人联想到高等生物的发育过程。

细菌包含极其广泛的形式，而且在进化上出现了高度的分支。要确定它们的系统发生关系是困难的，没有像真核生物那样的化石记录可以利用。然而，分子生物学的方法，最初以核糖体 rRNA 的序列为基础，近来更多地以全基因组序列为基础，已经变革了原核生物的系统发生学，导致古菌作为原核生物的一个独立的类群被确认，如图 1.7 所示。

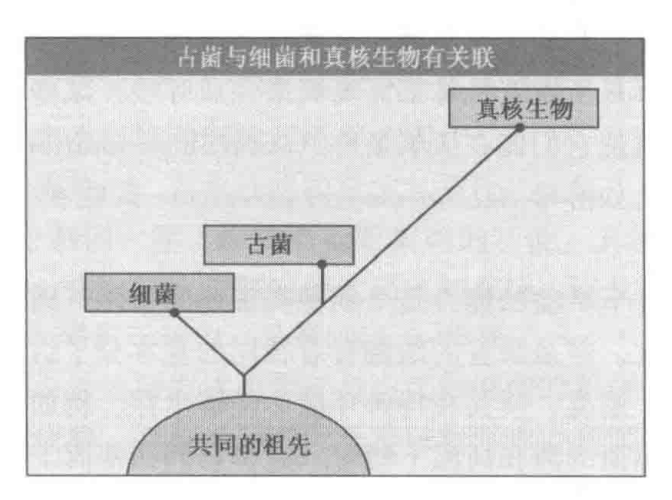


图 1.7　采用分子方法的系统发生分析显示，有机体可以被分为三大域 (domain)。

古菌在外观和结构上都与细菌相似，它们是微小的单细胞生物。它们倾向于生活在极端的环境条件下（如高温），最初被误认为是能适应这种环境的细菌。像细菌一样，古菌也只有单一细胞隔室，没有内部膜结构。它们有许多共同的形态学特征，比如坚硬的细胞壁或包围质膜的荚膜以及伸入环境中的鞭毛。最主要的区别在分子水平，它们的组分和细菌不相似。它们的基因表达系统与真核生物的关系更为密切，而不是和细菌。与细菌和植物相比，它们的细胞壁由更多亚单位构成。它们的膜成分含有的脂种类不同。它们基因组的复杂性可以与自由生活的细菌相媲美。

（原核生物的细节见第 16 章原核细胞生物学）

1.4 原核生物适应在多样的环境下生长

关键概念

- 原核生物适应于多种极端环境条件，突出地表现了在构建活细胞时可能的变异。

原核生物有多种多样的生活方式，很多都适应于特定的生态位（niche），包括一些极端的条件，扩大了生物可能存活的环境范围。根据在不同温度下生长的能力，原核生物可以被分为三类：

已知的大多数原核物种是中温菌（mesophiles），在 25～40℃之间生长最旺盛。这类细菌被广泛地研究，因为其中包括人类病原体。

嗜冷菌（psychrophiles）在 15～20℃之间生长最旺盛，一些物种在 0℃尚能生存。它们习惯于生活在冷水和土壤中。

耐热菌（thermophiles）生活在 50～60℃之间，有些能耐受高达 110℃的温度。

原核生物也能以它们生活在酸性或碱性环境中的能力进行分类。许多微生物能耐受极端的 pH 变化。嗜酸细菌（acidophiles）生长最适 pH 低于 5.4。一些土壤原核生物是已知的耐碱性最强的有机体（alkaline-tolerant organism），有时在 pH12 时仍能生长。这些原核生物内部 pH 维持在 7 左右，而细胞壁保护它们抵抗外部的极端环境。

你可能以为在所有的细胞生活环境中氧都是必需的。氧的基本功能是作为呼吸作用中的电子受体。然而不是所有有机体都需要氧来完成呼吸，某些有机体通过发酵而不是呼吸来产生能量，这就使它们能在厌氧条件（anaerobic condition，缺乏氧）下活动。一些单细胞真核生物，比如酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 既能在需氧环境也能在厌氧环境中生存。

能在这些极端条件下活动的能力是个别种类细胞的特性，因此大大延展了细胞与环境相互作用方面的限度。但是所有的细胞有着相同的基本分子组成，也有个别成分有适应性变化，如蛋白质、脂类，使其在特殊环境中能够生存。例如，嗜冷菌产生的酶在低温下活力最高，而耐热菌的酶在高温下稳定（这使它们在基因工程中可以有某种应用）。

1.5 真核细胞含有多膜分隔的隔室

关键概念

- 真核细胞的质膜包围着细胞质。
- 细胞质内还有膜包围的单独隔室（compartment)。
- 细胞核是细胞质内最大的隔室，含有遗传物质。

生物组织复杂性的增加主要来自真核细胞。真核细胞不具有均一的内环境，而是分为若干隔室（compartment)，每间都被膜包围着。图 1.8 显示真核细胞内部被分为两个主要的隔室：细胞质和**细胞核（nucleus)**。细胞内由膜包围的隔室叫**细胞器（organelle)**。细胞核是最重要的细胞器。细胞质主要是指细胞的其他部分，也就是细胞质膜和细胞核之间的体积（除细胞核之外的一切)。

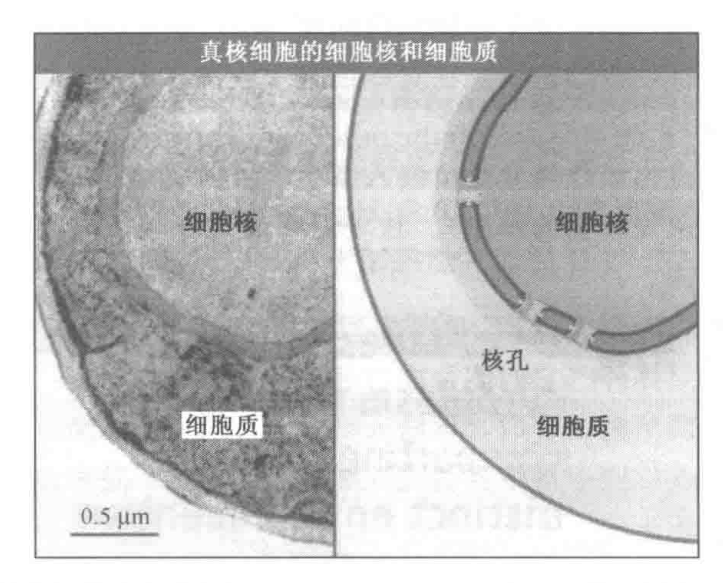


图 1.8 真核细胞分为细胞质和细胞核两部分。核膜上的孔洞用来在两个隔室之间转运分子。照片来自 *The Jounal of Cell Biology*，1988，vol. 107，pp. 101-114，获得 Rockefeller 大学出版社的版权许可。

大分子通过核孔进出细胞核，它们是核膜上的蛋白通道。孔的大小足以让小分子完全透过，因此细胞核的多水环境和细胞质没有差别。

遗传物质包含在细胞核内。真核细胞的遗传复杂性变化很广。最简单的单细胞生物基因组含有大约 5000 个基因。除了原核细胞能编码的功能，真核细胞还需要特别编码其所有额外的结构元件、蛋白质定位到它特定隔室的系统，以及更复杂的基因表达调控系统，这个系统将 DNA 隔离于核内（见MBIO：1-0002)。

真核生物变化多样，从生活方式类似于自由生活细菌的单细胞生物到由不同类型细胞构成的复杂的多细胞生物。真核细胞起源于单细胞生物，其代表性特征在多细胞生物发生之前就已经确立，这就解释了真菌、植物和动物细胞基本特征的保守性。

要记住的重要一点是，所有的细胞隔室中大分子的浓度都很高。现代细胞已经大大加强了最初定义的原始细胞的特征，不仅仅把大分子与环境隔离，还起到了浓集的作用。细胞核中，DNA 的浓度已经相当于高黏度的胶体。在细胞的其他隔室中，蛋白质

浓缩呈高密度。这样组织的后果就是定位变得相当重要。

1.6 膜使细胞质保持具有不同环境的多个隔室

关键概念

- 细胞器由膜包围，维持和周围胞质溶胶不同的内部环境。

真核生物的细胞质中，除了细胞核通常还有其他膜包被的细胞器。通常用**胞质溶胶**（**cytosol**，或称细胞液）来形容细胞质中除去膜包被的隔室之外的水状环境。胞质溶胶可以看作是由质膜包围的单一隔室，并和其内所有细胞器的外表面相接触。我们可以将其看作一个特化的隔室，它的主要功能是合成蛋白质供自身使用和运入细胞器。

细胞内的膜有共同的一般结构——脂双层，这和包围细胞的质膜一样。每种膜含有的脂质种类不同，但一般性质是一样的。正像质膜的不透过性区分了细胞的内外部一样，细胞器膜的不透过性也区分了细胞器内部和周围的胞质溶胶。离子溶质不能跨膜自由交换。这一基本特性使得细胞器能在真核细胞中保持特定的环境（细胞核由于核孔的存在而成为一个例外）。

大分子和小分子进出膜性隔室是由嵌入膜中的蛋白质控制的（类似于细胞质膜上控制细胞输入输出的蛋白复合物的作用）。独立隔室的内部叫做**内腔**（**lumen**），其水状环境和周围胞质溶胶不同。

每种细胞器的内腔里都进行特殊的功能活动。这就要求特定的蛋白质定位于细胞器内。除了线粒体和叶绿体外（它们能合成自己的一部分蛋白质），细胞器不能合成蛋白质，蛋白质必须在胞质溶胶中合成，再输入细胞器。

图 1.9 显示了真核细胞中最重要的膜性细胞器的位置。每种细胞器腔内的水状环境都调整得和它的功能相适应。

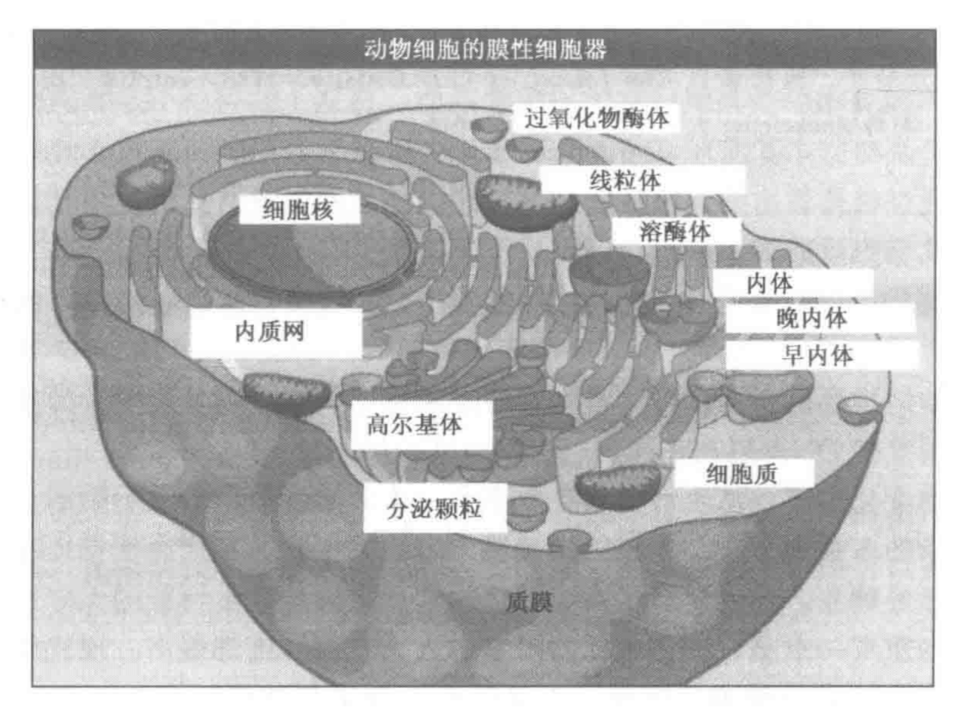


图 1.9 包含许多膜包围的隔室的真核细胞的细胞质。

内质网（endoplasmic reticulum，ER）是与核膜外层比邻的一系列复杂的膜片层。内质网的内腔提供了氧化环境（类似于细胞外部），这对于它的这项功能是非常有用的：折叠蛋白质和装配多亚基的寡聚体。

在一个典型的真核细胞中，一系列由膜分界的隔室通过膜分裂和融合彼此相关并相互作用。内质网、**高尔基体（Golgi apparatus）**（由一系列膜围成的扁平碟状物堆叠而成）和高尔基体反面网状结构（*trans*-Golgi network）构成了**分泌途径（secretory pathway）**的主要组分，它们的膜发生剪切和融合，将内容物和膜蛋白由一个隔室运向另一个隔室。分泌泡从高尔基体反面（*trans*-Golgi）离开，与质膜发生融合。蛋白质的共价修饰包括添加小分子糖等都发生在内质网和高尔基体中。这个网络中含有的其他细胞器是内体（endosome）和溶酶体（lysosome），蛋白质的降解发生在其中。

线粒体（出现在所有真核细胞中）和叶绿体（出现在植物中）与能量的管理有关。线粒体担负着基本的反应，将富含能量的中间媒介物——ATP 提供给细胞。叶绿体担负着二氧化碳的光合作用，使得绿色植物能产生小的含碳分子作为食物供给的一部分。叶绿体的存在是植物界细胞有别于动物界细胞（或其他界细胞）的主要特征之一。

图 1.10 显示了在典型情况下，每个细胞质隔室中离子和小分子浓度各有不同。一个显著的差异是内质网中有着极高的钙离子浓度。另一个事实是内体和溶酶体的 pH 远远低于细胞质。内体大致可以分为两组：pH 在 6.5～6.8 的是早内体，晚内体中 pH 低至 4.5。相比之下，线粒体基质的 pH 高于细胞质，如图 1.11 总结的。

Ca^{2+}浓度在细胞不同隔室间存在差异	
细胞器	$[Ca^{2+}]$
线粒体：膜间隙	高(~10^{-3}M)
胞质溶胶	低(~10^{-8}–10^{-7}M)
细胞核：核膜内腔；内质网	高(~10^{-3}M)

图 1.10　一个真核细胞中的各个隔室可能有不同的离子环境。

（关于细胞器的更多细节和分泌途径见第 3 章蛋白质的膜定向转移和第 4 章蛋白质在膜之间的运输）

1.7　细胞核含有遗传物质，并有核膜包围

关键概念

- 细胞核是细胞中最大的细胞器，由双层膜包围。
- 遗传物质集中在核的一个区域。
- 核孔为大分子跨膜进出细胞核提供了条件。

pH在细胞不同隔室间存在差异	
细胞器	pH
早内体	6.5～6.8
晚内体	5.0～6.0
溶酶体	4.5
高尔基体反面网状结构	6.5～6.7
线粒体 基质	8
线粒体 膜间隙	7
胞质溶胶	7.4
细胞核/内质网	7.4

图 1.11　细胞的 pH 图，说明不同的细胞器有不同的 pH。

细胞核通常是真核细胞中最大的可见隔室，见图 1.12，它包含了几乎所有的遗传物质（事实上，除了有限数量的基因是由线粒体或叶绿体携带的之外）。细胞核的体积与它包含的 DNA 总量有关，因此它在细胞中所占体积的比例也变化很大；典型的在酵母细胞中占 1%～2%，在大多数成体动物细胞中约占 10%（见 5.2 细胞核表型在不同细胞类型和生物体中有区别）。遗传物质形成的团块叫做**染色质**（**chromatin**），集中在细胞核的一个区域。

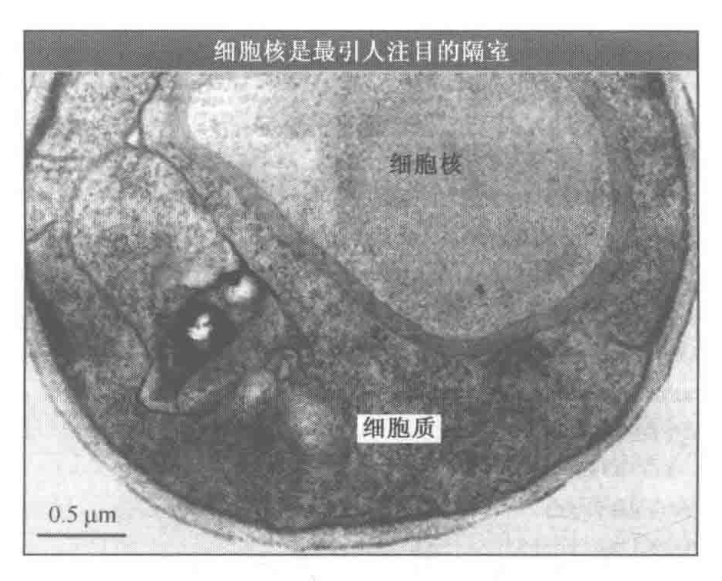


图 1.12　尽管核占细胞总体积的比例随细胞类型而不同，核通常仍然是真核细胞中最大、最引人注目的隔室。照片来自于 *The Journal of Cell Biology*，1988，vol. 107，pp. 101-114，获得 Rockefeller 大学出版社的版权许可。

细胞核由**包膜**（**envelope**）包围，包膜由两层同心的膜组成，即外核膜和内核膜，

如图 1.13 所示（见 5.6 细胞核的界限是核被膜）。两层膜被空腔分隔。核膜外层和内质网膜相连，核膜的腔也与内质网腔相通。核膜内层通常有网状纤维支持，叫做核纤层(nuclear lamina)，它位于核中，锚定在内核膜上。

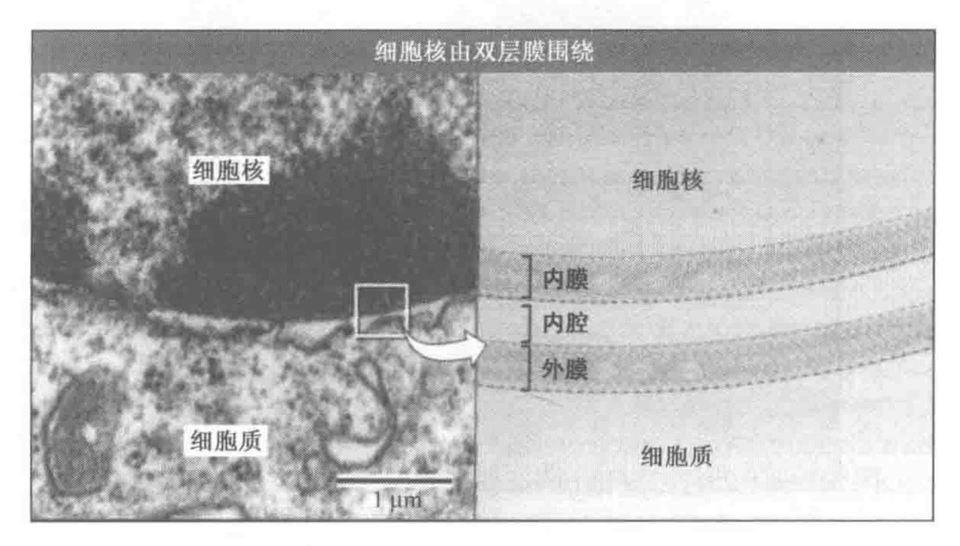


图 1.13　细胞核被核膜包围，核膜包括内核膜和外核膜，两层膜由空腔隔开，这一空腔与内质网腔相通。照片得到 Peterson 癌症研究所 Terry Allen 的许可。

由于小分子在胞质溶胶和细胞核之间自由移动，隔室的水状环境是相同的。然而大于 40 000Da 的物质（对应于小的蛋白质）进出核就必须通过**核孔复合物（nuclear pore complex)** 转运，核孔复合物是埋在核膜中的。在电子显微镜水平上核孔是核膜最明显的特征（见 5.9 核孔复合体是双向通道）。每个核孔复合物都有一个中心通道，大于自由扩散尺度的物质通过它们进出。这使得细胞核在蛋白质和其他大分子方面与胞质溶胶有着不同的组成。

细胞核含有特定功能的**亚隔室（subcompartment)**，但是它们没有被膜包围（见 5.4 细胞核包含非膜界限的亚单位）。核中主要的亚隔室是**核仁（nucleolus)**，在光学显微镜下可以看到，核糖体 RNA 在这里合成，核糖体亚单位在这里装配。

真核细胞拥有细胞核的好处是什么？核能够保护 DNA 并且集中了调控蛋白和修复酶(repair enzyme)。人类基因组比 *E. coli* 基因组大 750 倍，因此任何一段特定的序列都只对应着基因组的一小部分。这就要求调控因子浓度更高才能找到目的物。细胞核帮助将目的物（例如基因组）和调节蛋白限定在细胞中一个更小的范围内（例如细胞核），也能更好地保护基因组不受外界伤害。

拥有细胞核会产生重要的后果。图 1.14 显示了大分子在细胞核和细胞质之间的运输是一个双向过程。细胞核中需要的所有蛋白质（包括复制和转录所需的蛋白质）必须从细胞质运入。相对照的是，细胞核转录而来的 mRNA 则必须外运到细胞质中，因为蛋白质合成装置是位于细胞质中的。这一点和原核细胞中的情形相当不同，原核细胞中转录和翻译是耦联的，发生在同时同地。分子进出细胞核的移动也是调控的重要目标。

典型的真核细胞都有一个细胞核，然而也有例外情况使得细胞有许多核。这种情况显著地出现在昆虫的早期发育过程中，比如果蝇，当细胞核分裂了多次，而细胞却没有分开时，就会形成**合胞体（syncytium)**，在一个普通的细胞质中含有数百个核。多核体

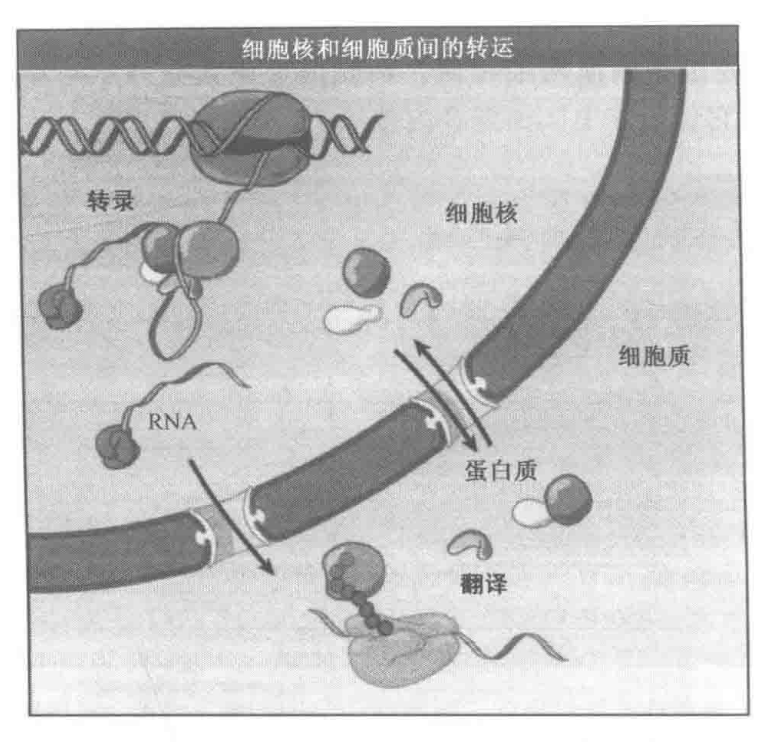


图 1.14 RNA 从细胞核转运到细胞质，而蛋白质被运进细胞核（有时又会被运送出来）。

形成的另一种情况就是动物肌肉细胞融合的时候。另一种极端，就是在一些已特化的细胞类型中，比如哺乳动物的成熟红细胞缺乏细胞核（由于注意到它们是来自细胞的终末分化产物，遂引发了争论：究竟这样的物体能不能算作“细胞”?）。

1.8 质膜使细胞保持内稳态

关键概念

- 亲水分子不能通过脂双层。
- 质膜对水的透性高于对离子的透性。
- 渗透压来自膜两侧离子的差异。
- 质膜有特殊的系统用来转运离子和其他溶质进出细胞。
- 转运系统使细胞维持一个和外环境不同的恒定内环境。
- 离子通道是镶嵌在膜上的蛋白质类结构，允许离子穿过细胞膜而存留在水状环境中。

质膜实现了完整细胞所需要的的几项功能：

- 它在一个有限的体积中包含着细胞内含物。
- 它使得细胞内部水环境和外部不同。
- 它含有蛋白质类复合物控制分子进出。
- 它含有细胞内部和外环境之间的信号传递系统。

膜的固有性质使得细胞需要调控水和离子的进出。图 1.15 显示膜对疏水化合物具有可透过性。对水和离子溶质透过性的不同有一个重大的后果：这就是产生了跨膜**渗透压（osmotic pressure）**，以此对膜两侧已溶解物质的浓度差异做出反应。

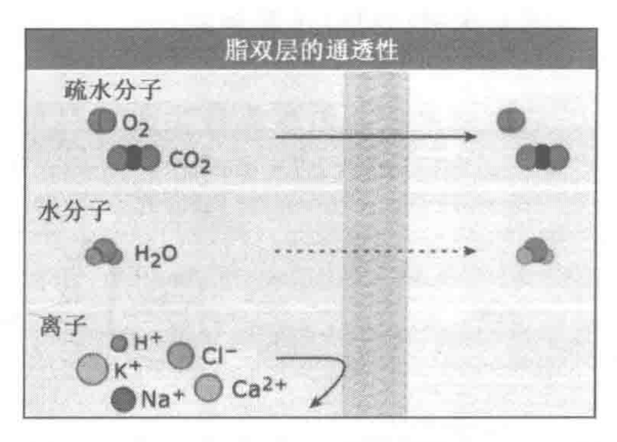


图 1.15　和疏水分子及水分子相比，离子不能自己快速地通过脂双层。

例如钠钾离子穿过脂双层扩散的速率大约是水扩散速率的 $1/10^{-10}$，结果，当膜两侧的离子浓度出现了差异，水便跨膜运动来平衡两侧的离子浓度，如图 1.16 所示。

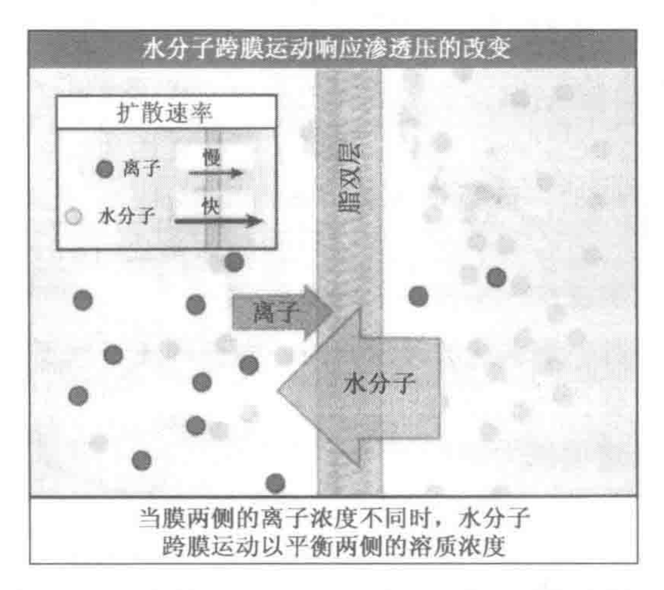


图 1.16　水的跨膜运动是在渗透压作用下发生的，运动的方向取决于膜两侧溶质的相对浓度。

如果细胞没有控制溶质浓度水平的机制，当外部的溶质浓度高于内部或者相反时，细胞将因渗透压反应而发生皱缩或膨胀，这样，细胞的大小就会随着外界条件而波动。在极端条件下，这会使细胞浓缩成无功能的一团或者胀破，产生致死的后果。

细胞应对这一情况的发生就是控制离子和水穿过质膜的运动。它维持恒定内环境的能力称做**内稳态（homeostasis）**。无论是单细胞还是多细胞生物，这是所有细胞都具备的一项重要功能。动物细胞内稳态的一项主要作用就是通过平衡离子组成来处理渗透压问题，避免水分积累。为了维持稳态，离子和水分以一种有控制的方式进出细胞。

对于单细胞生物来说，这是必需的，因为外部环境可能常常有大的波动。对于多细胞生物来说，稳态使个体的细胞维持和胞外液体不同的内部环境。典型的是细胞内部比外部环境的钾离子浓度高，而钠、钙离子浓度低。

图 1.17 显示脂双层中的蛋白质复合物提供了穿过膜的通道，它的存在使跨膜成为可能。蛋白质复合物的外表面和脂双层接触，而内表面围着一个水状的环境（aqueous

environment)。一种离子或者亲水蛋白可以不接触脂双层而穿过这样的水状通道。针对各种特定底物的通道是特异性的。

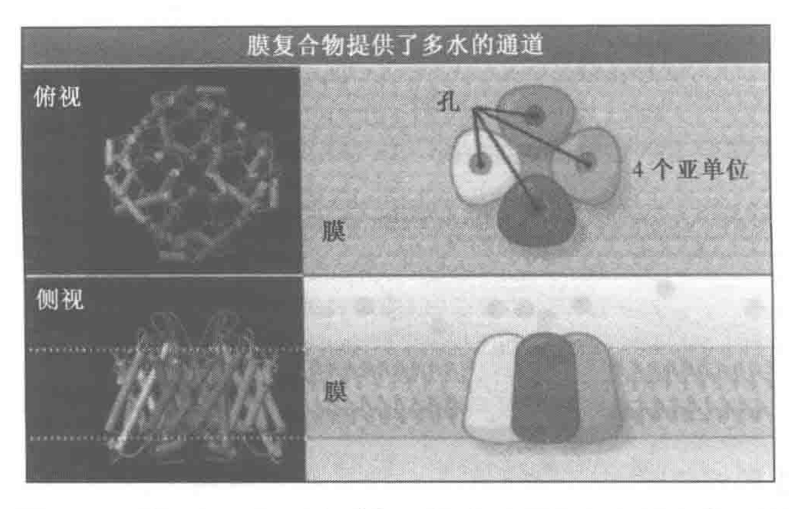


图 1.17 嵌入膜中的蛋白质复合物为离子和小分子由膜一侧向另一侧运输提供了多水的通道（pore）。

运送一种离子穿膜的机制取决于是由高浓度向低浓度运输还是相反的方向。细胞内外离子浓度的差异产生了一个跨膜梯度。当离子顺梯度运动——即离子从浓度高的膜的一侧流向浓度低的另一侧时——**离子通道（ion channel）**使浓度梯度得以驱动离子穿膜。当必须逆着浓度梯度运输离子时，需要一种**载体蛋白（carrier protein）**，它是耗能的（见 2.2 通道和载体是膜转运蛋白的主要类型）。

如果通道仅仅是建造一个水状的跨膜通路，两侧的离子状态会很快地达到平衡。为了维持两侧离子环境的整体性（integrity），通道平常是关闭的，仅在物质跨膜运输时才打开。打开或关闭通道的能力叫**门控（gating）**。图 1.18 显示门（gate）完成了构象变化，使离子穿过通道移动或者阻止它移动。门能够被小分子配基、电压或温度控制。

除了控制溶质流动之外，所有的细胞都有跨膜转运水的**水孔蛋白（aquaporin）**（见

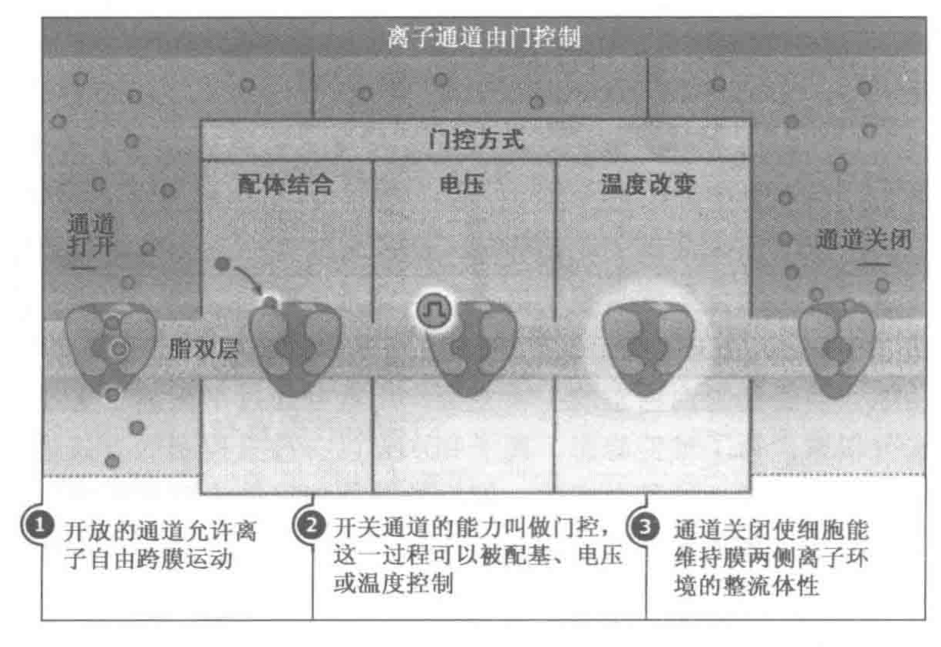


图 1.18 门控（gating）控制离子通道开关的过程。

2.11 选择性水运输通过水孔蛋白通道发生）。水孔蛋白经特殊的通道运送水分来对渗透压做出反应。

植物细胞以一种不同的方式应对渗透压。在植物细胞中，水在特殊的叫做液泡（vacuole）的隔室中积累，内部压力由坚硬的细胞壁承受，事实上这被用于促使细胞膨胀（见 17.10 细胞膨大由液泡膨胀所驱动）。

1.9 细胞中的细胞：有包膜的细胞器可能来自于内共生

关键概念

- 有包膜的细胞器可能起源于原核细胞的内共生现象。

真核细胞的三个细胞器——细胞核、线粒体、叶绿体都是有包膜包围的。图 1.19 显示它们是双层，外膜朝向外部空间，它和内膜之间由一个膜间空间隔开，内膜限制着内部的隔室。所有由双层包膜包被的细胞器都含有遗传物质（其他有膜包被的细胞器都是一层脂双层膜包围，不含有遗传物质）。

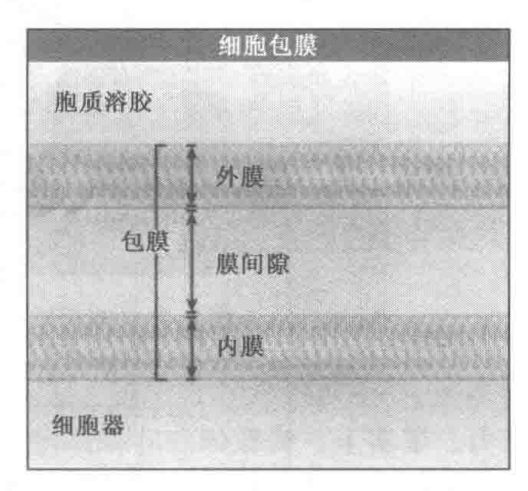


图 1.19 包膜由双层膜构成，内膜通过膜间空间与外膜隔离，每层膜都是脂双层。

双层膜包被隔室并含有遗传物质的构造立即使我们联想到了原核细胞。这种相似性为这一观点提供了基础，就是这些隔室可能由宿主细胞吞没的原核细胞演化而来。这类似于**内共生（endosymbiosis）**的情况，某种类型的细菌进入真核宿主细胞的胞质，并在细胞质中生存。因此，这个细胞器进化的模型叫做**内共生学说（endosymbiotic theory）**。

图 1.20 展示的一个模型表现了当一个细胞吞食另一个细胞后，细胞器在进化期间可能是怎样产生的。被吞食的细胞被两层膜包围：一层是它自己的，另一层是吞食细胞的。从吞食细胞的质膜脱离下来进入细胞内部就成了一个带双层包膜的隔室。

如果被吞食的细胞赋予宿主一种新的能力，比如进行光合作用的能力，就可能导致线粒体和叶绿体的发生。在适当的时候，被吞食的细胞会丧失它不再需要的功能，因为周围的细胞质已经提供了这些功能，并且它会逐渐特化成专门为宿主提供所需功能的细胞器。

线粒体和叶绿体比独立生活的细菌少很多基因，并且已经丢失了独立生活所必需的很多遗传功能（比如为代谢途径编码）。事实上，大多数为细胞器编码的基因现在定位在细胞核（蛋白质在胞质中合成，再运输到细胞器）。这些基因一定是在内共生事件发生后的某一时间从细胞器转移到细胞核里的。

我们可以通过对比相同基因在不同物种中的定位来追踪细胞核和细胞质之间的物质交换。从最初的吞噬事件以来，大多数细胞器基因组和核基因组之间的遗传信息交换都是向核基因组的功能转移，尽管也可能有朝另一个方向的转移（见MBIO：1-0003）。

线粒体和叶绿体这两个细胞器都保持了表达自己的遗传信息，合成一部分蛋白质的

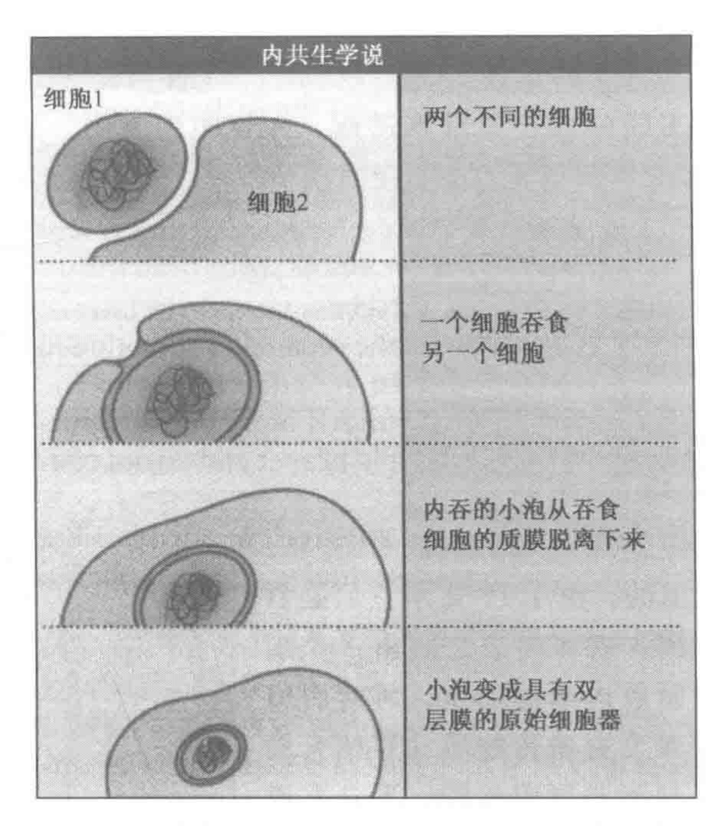


图 1.20　双层膜包被的细胞器可能起源于一个细胞吞食另一个细胞。

能力。事实上，线粒体和叶绿体内共生起源的最好证据在于它们的基因表达系统。这两种细胞器的表达系统都与现代原核细胞亲缘很近，而与真核表达系统关系较远。序列相似性说明线粒体和叶绿体是分别进化的。线粒体和 α 紫细菌同源，而叶绿体似乎和蓝细菌最为接近。

和细菌的亲缘关系也能从细胞器的增殖方式上看出来。线粒体和叶绿体的分裂方式很像细菌，都是通过膜内陷造成内部的分裂。分裂中用到的组件也和细菌的有关系。

细胞核的起源就不那么明显了。可能在真核生物进化的早期，一个原核细胞吞食了另一个，被吞食细胞接管了结合体（combined unit）的遗传功能。再一次被赋予了基因表达这种装置的性质，使得真核细胞和古菌彼此的相关性要高于和细菌的相关性。但是真核生物也有和细菌相关的基因，大多数是和代谢功能相关的。一种可能性是真核细胞经融合事件起源，涉及细菌和古菌，两者的基因最终被整合进由被吞食细胞形成的核。

1.10　DNA 是细胞的遗传物质，但是还有其他形式的遗传信息

关键概念

- DNA 携带着编码细胞所有蛋白质序列的遗传信息。
- 信息也可以被细胞的可遗传结构携带。

DNA 双螺旋带有活细胞的所有基本遗传信息。对细菌和古菌来说，所有的遗传信息都是由一条染色体携带的。对于真核生物，所有的基因都在核染色体中，少数的序列

信息由线粒体和叶绿体（植物细胞）携带。

DNA 也可以是病毒的遗传物质，但是一些病毒用 RNA。所有的病毒都用蛋白外壳（protein coat）包裹遗传物质。病毒当然不是活的有机体（living organism），但是在感染细胞时它有跟宿主细胞体系一样的遗传学功能。

细胞也能保存不是由 DNA 序列携带的信息。这叫**表观遗传（epigenetic inheritance）**现象（见MBIO：1-0004）。这一概念是指两个细胞有不同的表型，虽然在控制同一表型的位点上 DNA 序列相同。

在**"疯牛病"（mad cow）**中起作用的蛋白质类物质是表观遗传现象的一个例证（见MBIO：1-0005）。图 1.21 显示了 PrP 蛋白既能以简单的可溶状态存在，又能获得不同的构象形成大的自聚物（self-perpetuating）。这些自聚物是疾病的起因。它们是自我生存的，因为它们能促使新合成的 PrP 蛋白获得可聚集构象。类似的作用也发生在酵母中，这种表观遗传现象分布相当广泛（见MBIO：1-0006）。在这些情况下，表型由是否存在先前的聚合物决定，而不是由编码这些蛋白质的基因序列决定的。

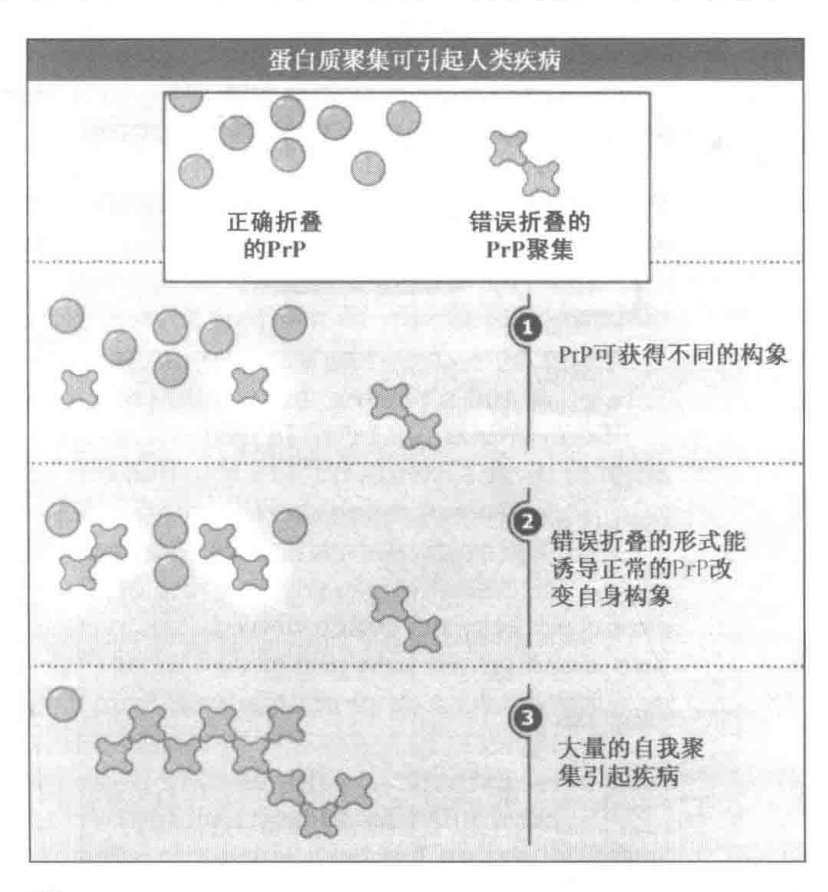


图 1.21　PrP 能以可溶性蛋白状态存在，或者以另一种构象形成聚合物。这些聚合物又引起新合成的 PrP 蛋白采取与它们同样的构象。

我们不知道细胞除了 DNA 序列之外是否还需要其他形式的信息。如果我们能够读出编码所有蛋白质的 DNA 序列，它们能够相互作用，形成所有的细胞结构和功能么？如果不能，使新细胞从先前存在的细胞中发生的未看到的信息本质究竟是什么？是否需要先前存在的结构作模板来组装细胞结构（见 1.19 细胞结构定位的重要性）？

1.11 细胞需要 DNA 损伤修复机制

关键概念

- 遗传物质不断地遭受着环境外力和细胞系统错误的伤害。
- 修复系统减少对 DNA 的伤害，对所有活细胞的生存都是必要的。

保持遗传信息的完整性和精确的复制一样重要。事实上，人类基因组中专门用于修复 DNA 伤害的基因比基本复制体系本身的基因还要多。

DNA 序列的个别错误主要发生在两方面。首先，错误可能在复制期间发生，错误的碱基被插入了新链。复制系统有校对机制（proofreading mechanism）来防止这样的错误，将这类错误减少到十分低的比例。其次，DNA 可能被外界环境的作用伤害，包括射线或修改碱基的化学物质。细胞包含很多种**修复系统（repair system）**，能够把受损的 DNA 序列恢复到原来的状态（见MBIO：1-0007）。图 1.22 说明了修复系统识别并移除受损的 DNA，取代删除物的过程。

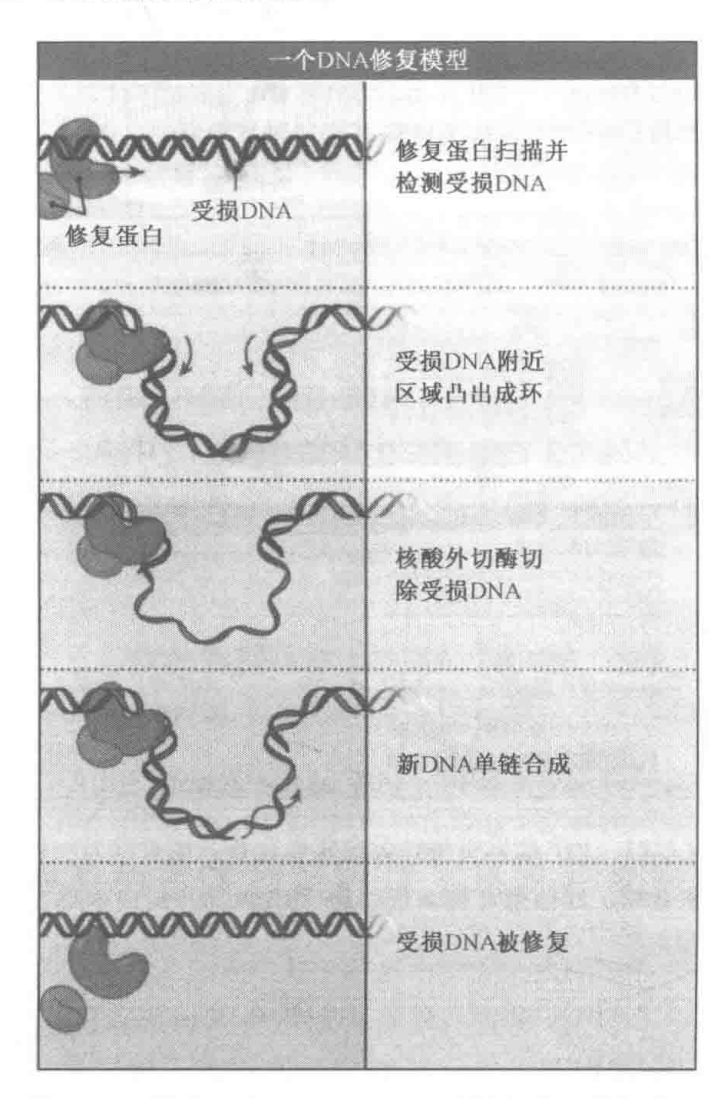


图 1.22 修复系统识别 DNA 的受损位点，剪除带有损伤的一段核苷酸，重新合成替代链。

尽管有修复系统的存在，但还是有一些突变发生，但这个比率是可以接受的——确实，一定的突变率对于进化要求的多样性也是必需的。每个基因每代发生突变的概率约为10^{-6}次，或者，从细菌到高等真核生物每代每对碱基发生改变的平均概率为10^{-9}～10^{-10}。甚至在极端条件下生活的生物也有相似的概率。这些相似性说明总突变率已是受选择力支配的，选择力使大多数有害突变和一些有益突变达到平衡。

没有任何细胞能够在没有修复系统的情况下生存。例如，如果把大肠杆菌 *E. coli* 的全套修复系统移除，单用紫外光照射就将使细菌致死，而正常大肠杆菌能修复相当多的破坏碱基。

1.12 线粒体是能量工厂

关键概念

- 所有的细胞都有一套方法将环境中摄取的能量转化成通用媒介物（common intermidiate）ATP。

细胞从环境中摄取食物来获取能量。这些能量必须被转变成某种形式才能分发到整个细胞。最常用的方式（不仅在线粒体，而且在原核细胞的相当的能量处理系统中）是将能量存储成一种通用分子形式，在细胞需要时随时随地都能使用。能量处理的细节随着细胞种类的不同而变化，但所有活细胞的共同特点是具有将环境提供的能量转变为ATP 的能力，ATP 能够按需要为单独的化学反应提供通用的驱动分子。

ATP 能以两种途径产生，一种在胞质溶胶（cytosol），另一种在线粒体。第一种途径存在于真核细胞的胞质溶胶或原核细胞中，糖酵解过程将葡萄糖降解成丙酮酸，这一过程伴随两分子 ATP 生成。这一反应可以在无氧条件下（anaerovically）进行。

第二种途径是能量产生的主要途径，发生在真核细胞线粒体中。这个在线粒体中制造 ATP 的过程叫做氧化磷酸化（oxidative phosphorylation），需要电子传递链的参与。糖酵解产生的丙酮酸进入线粒体基质被降解，并和辅酶 A 结合生成乙酰辅酶 A（acetyl CoA）。乙酰辅酶 A 的乙酰部分又被柠檬酸循环（citric acid cycle）降解成二氧化碳，释放氢原子。氢原子用来使 NAD^+ 还原成 NADH，然后 NADH 氧化释放一个质子（proton）和一个电子。

氢离子（质子）跨膜移动，从基质进入膜间空间，而电子通过一系列蛋白载体沿膜传递，图 1.23 阐明了这个过程。结果是产生了一个跨膜质子梯度。这个梯度驱动质子通过一个大的蛋白复合物 ATP 合酶（ATP synthase）跨膜返回，质子流驱动 ADP 和无机磷酸合成 ATP。这个过程叫做**化学渗透假说（chemiosmosis）**。

线粒体通常被称做（真核）细胞的能量中心；它们为代谢过程和实现结构变化提供所需的能量。为了更加精确，它们把环境提供的能量转变为细胞能利用的形式。遍及所有真核生物的线粒体结构和功能的保守性，说明创造它们的内共生事件一定发生在真核生物进化的最早期。

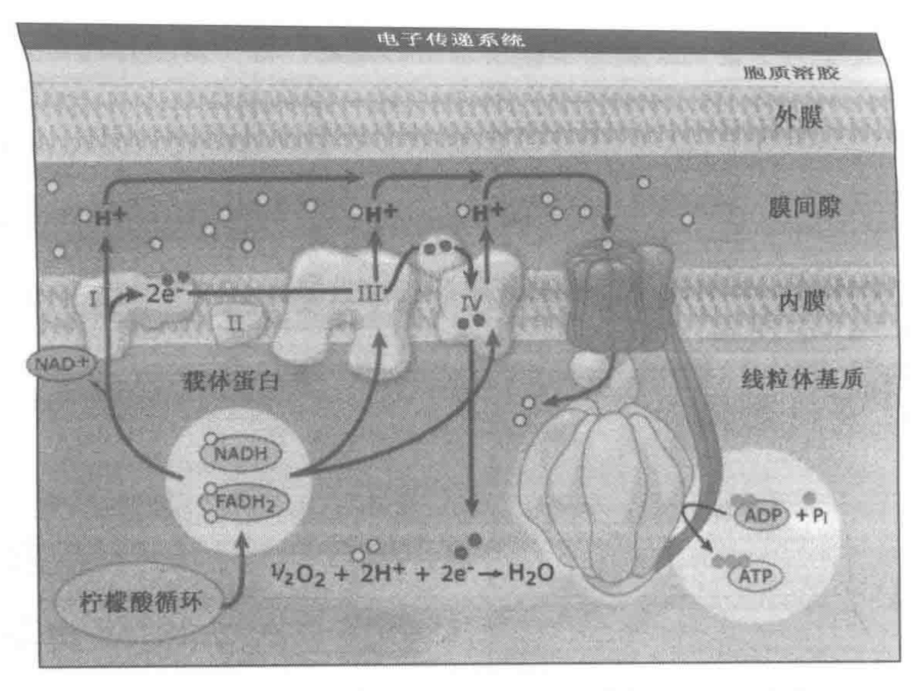


图 1.23　化学渗透假说，用质子的转移来驱动 ATP 合成。

1.13　叶绿体为植物细胞提供动力

关键概念

- 质体是植物细胞中由膜包围的细胞器，能够发育成叶绿体和其他特化形式。

质体（plastid）是膜包围的细胞器，只在植物细胞中存在（见 17.20 植物细胞具有称作质体的特有细胞器）。植物细胞中很多基本的代谢反应都发生在质体里。质体高度特化成几种不同的形式，但它们都执行一些共同的功能。它们是脂肪酸、多种氨基酸、嘌呤和嘧啶进行合成反应的细胞器。相对的，这些反应发生在动物细胞的胞质溶胶里。

两层紧密相对的膜——内膜和外膜，围住质体，而膜间的空隙将两层分开，就像线粒体中那样。**质体基质（stroma）**是由内膜包围的质体内部空间。基质和线粒体基质相似，也包含质体的 DNA、RNA 和很多蛋白质，如核糖体和酶。与线粒体基质不同的是，质体基质中含有膜包围的碟状物叫做类囊体（thylakoid），类囊体膜含有能量产生系统。

所有类型的质体都由一种共同的前体细胞器叫做原质体（proplastid）发育而来。原质体比分化的质体小，缺乏内膜，没有特化。当一个植物细胞发育成一种特定的分化细胞时，它的前质体发生分化并获得适应其细胞类型的功能。因此，质体发育的类型取决于细胞类型。

叶绿体是这样一种质体，它们使植物经一个系统合成 ATP，这个系统的电子是叶绿素分子被光激活产生的，而不是依靠葡萄糖的化学分解。有光存在时，叶绿体在植物的一些部位发育形成，比如树叶，它收集光，进行光合作用。生长在暗处的植物不能发育出叶绿体，在树叶中可发育出不同类型的质体。种子和茎还有另外一种质体叫造粉体（amyloplast），它们合成淀粉，呈颗粒状储存在基质中。一些类型的质体含有合成特定

小分子化合物的酶。叶绿体合成并储存一些色素叫做类胡萝卜素（carotenoid），它们是红色、橙色或黄色的分子，赋予花朵和水果颜色。

已分化的质体能根据环境或发育信号在不同类型之间转换。例如，当番茄成熟由绿变红时，当落叶树的树叶由绿变红、橙或黄时，叶绿素就变成了色素细胞。这个转变过程是由核基因表达控制的，质体丢失了叶绿素Ⅱ和类囊体膜，合成了类胡萝卜素。

1.14 细胞器需要蛋白质特异性定位机制

关键概念

- 所有的细胞器都从胞质溶胶输入蛋白质。

细胞器的不同功能特化意味着每种细胞器需要独特的小分子和大分子组分。然而这些成分的合成不一定要发生在它行使功能的细胞器中。很多成分都是从胞质溶胶运到细胞器内的，包括组成其基本结构的蛋白质（线粒体和叶绿体在其内部合成自己的一部分蛋白质）。

细胞器成分怎样到达它们起功能作用的位点呢？正如图 1.24 总结的那样，至少有 8 种主要的细胞器，小分子的输入和输出是由嵌入细胞器膜的蛋白质控制的。胞质溶胶里正在合成或合成后的蛋白质输入细胞器需要特殊的机制。

每种细胞器都有独特的功能	
细胞器	功 能
细胞核	基因表达蛋白向核外和向核内转运；RNA 向核外转运
内质网	蛋白质修饰；蛋白质共翻译转运
内体	蛋白质修饰；转运来自内质网的蛋白质
早内体晚内体	运向其他隔室的内化蛋白质之分选；内体中的功能蛋白来自于分泌途径
溶酶体	内化蛋白的降解；受胁迫细胞胞质溶胶蛋白的降解；溶酶体中的功能蛋白来自于高尔基体反面网状结构
线粒体	能量处理；胞质溶胶蛋白的输入；部分蛋白在该细胞器合成
过氧化物酶体	氧化过程；胞质溶胶蛋白质的输入

图 1.24 每种细胞器都有与其功能相关的独特组成和结构。

细胞器膜规定了蛋白质输入时的定位形式，如图 1.25 所示。当一个隔室是由单层膜包围时，如内质网或高尔基堆，蛋白质可以被指引插入内部或者膜上。当隔室是由双层膜包被的，如细胞核、线粒体和叶绿体，就有更多的可能性：特定的蛋白质可以定位在外膜上、膜间空间、内膜上或者内部。

蛋白质定位的基本原则是，目的地是特定细胞器的任何蛋白质都带有一段短的氨基酸序列，成为**分选信号（sorting signal）**或靶向信号（targeting signal）。针对每种细胞器至少有一种或者多种独特的信号。在通往蛋白质最终目的地的路上，分选信号被特定的细胞装置以一步或几步进行识别。

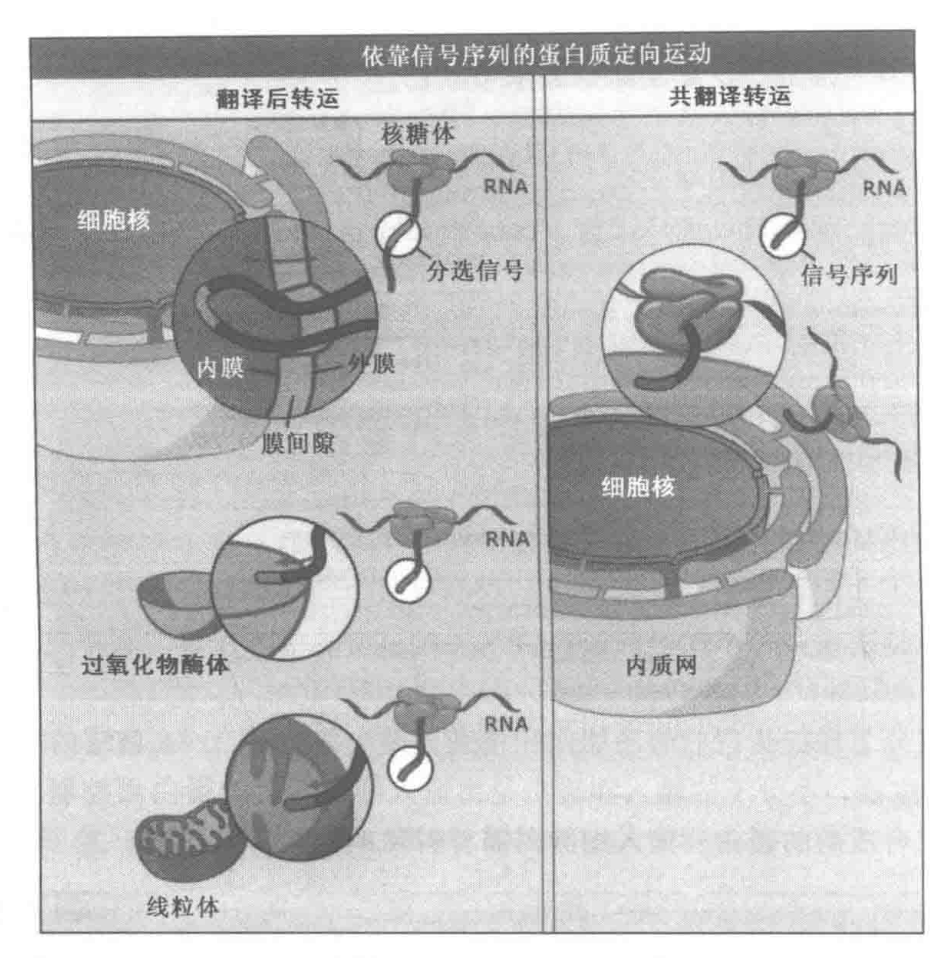


图 1.25　蛋白质能在细胞器膜上或腔内定位；在带有双层包膜的细胞器中，蛋白质也能在膜上或膜间空间定位。

1.15　蛋白质的跨膜运输

关键概念

- 蛋白质通过包埋在细胞器膜上的受体复合物运入细胞器。
- 对于细胞核以及像线粒体、叶绿体这样的细胞器来说，蛋白质是在合成后进入胞质溶胶再和细胞器发生联系的。
- 对于内质网，蛋白质边合成边向内质网膜上的受体复合物转移。

所有膜包围的细胞器都有共同的问题：怎样使胞质溶胶中造出的蛋白质穿过外围的膜。一个亲水蛋白穿过疏水膜需要克服很大的能量障碍。每个细胞器面对这个共同的问题都发展出各自不同的解决办法。膜上有蛋白类亲水孔可以用于转运蛋白质，这样就不需要和疏水膜相互作用。孔的性质以及它与被转运蛋白质的相互作用则取决于细胞器。

核孔（nuclear pore）是一种大型结构，它们用复杂的转运装置来鉴别蛋白质是应该转入还是转出。蛋白质在双层包膜的一侧被收集，被护送穿过孔，在另一侧被释放（见 5.11 蛋白质通过核孔选择性运入细胞核）。核孔延伸通过双层膜，蛋白质以其成熟构象从一侧运到另一侧。

线粒体和叶绿体这样的细胞器在内膜和外膜上都有特殊的蛋白质，功能是将目的蛋

白输入到细胞器内（不能外运）。输入的蛋白质是由细胞质核糖体合成并释放到胞质溶胶中的。它们都有特定的序列能够和细胞器膜上的受体相互作用（见 3.27 蛋白质输入到线粒体中起始于在线粒体外膜上识别其信号序列）。图 1.26 显示了穿过膜的通道十分狭窄，被运输的蛋白质必须先解折叠以便穿过，在另一侧重新折叠成成熟的构象。这就需要很多辅助蛋白——蛋白伴侣——参与，来控制蛋白质的折叠（见 1.17 蛋白质折叠与解折叠是所有细胞的基本特性）。一个有趣的例外是过氧化物酶体（peroxisome），它们发展出一种系统，使成熟的折叠状态下的蛋白质能输入（见 3.30 蛋白质在被运进过氧化物酶体之前先进行折叠）。

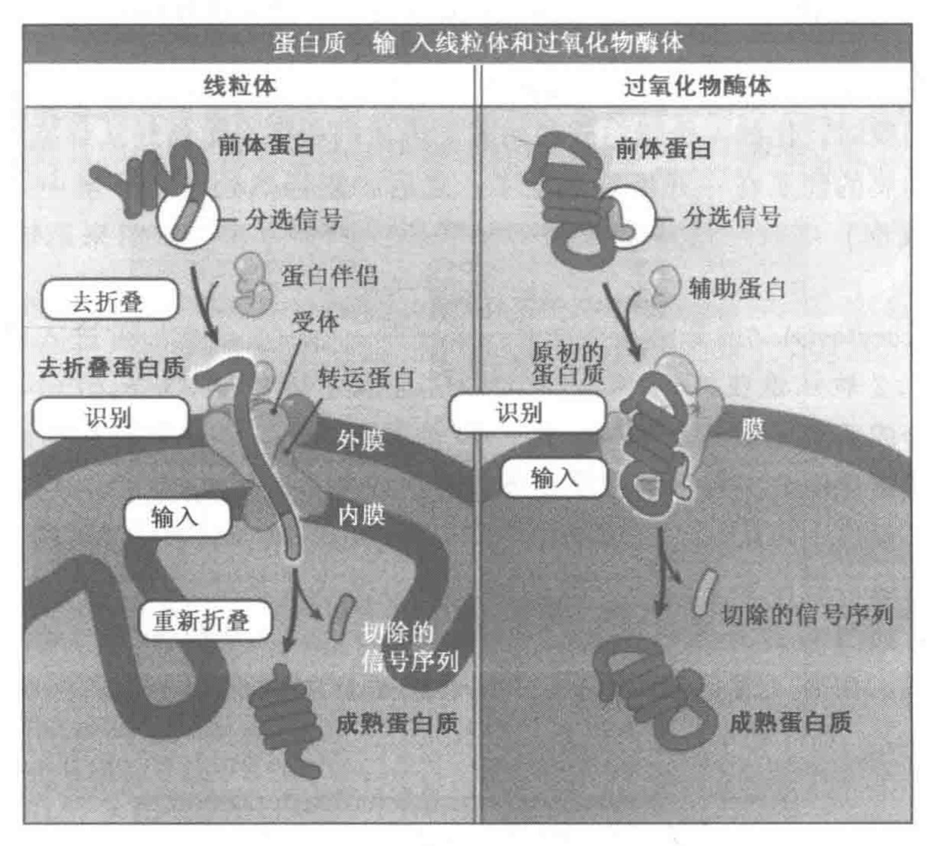


图 1.26 运入线粒体的蛋白质必须解折叠，相比之下，完整蛋白质能运入过氧化物酶体。

内质网、高尔基体、内体和质膜等是分隔的细胞器，但却使用相同的蛋白质运输和定位系统。当新生蛋白还在胞质溶胶的核糖体中进行合成时，这个过程就开始了，新生蛋白通过特异性的“信号序列”和内质网表面的受体相联系（见 3.2 蛋白质穿过内质网膜易位，进入分泌途径）。这一相互作用导致蛋白质插入通道，正在合成蛋白质的核糖体仍然与内质网膜联系着，蛋白质合成在继续。也就是蛋白质在合成过程中插入通道。

从这一刻开始，蛋白质或跨膜进入内质网腔或并入膜中。如果蛋白质的最终目的地在内质网之后，即在某高尔基堆（Golgi stack）或内体或细胞质膜上（或者从质膜分泌到环境中），它有特异性氨基酸序列被识别，则将通过所谓蛋白质运输过程被转运（见 1.16 经过内质网和高尔基体的蛋白质运输）。

对于定位在细胞膜上的蛋白质有一个更大的问题。同样的孔道用来联系膜和蛋白质，但不是让蛋白质通过，蛋白质从孔道侧面转移到膜中。对这一机制尚不了解，但是

可以设想包括孔的短暂瓦解，允许蛋白质疏水区和周围脂类相互结合。

1.16 经过内质网和高尔基体的蛋白质运输

关键概念

- 所有定位在内质网、高尔基体或细胞质膜上的蛋白质在最初合成时都是和内质网相连的。
- 蛋白质从一个隔室到另一个隔室的运输是通过小泡进行的，小泡从一处膜表面出芽与下一处膜融合。
- 蛋白质从外部输入细胞是通过反方向的小泡运输。

进入或穿过膜是蛋白质在一个单独的时刻要做的一项独特的事情。当一个蛋白质需要穿过一系列膜时，比如一个蛋白质初始时和内质网相联系，最终从细胞质膜释放出去的过程，它和膜的联系在一开始就发生了。之后，它仍然处在膜环境中，在一个**小泡（vesicle，或膜泡）**中从一层膜传送到另一层膜。相似的系统被用来运输蛋白质进出细胞。

胞吐（exocytosis）（或分泌）是这样一个过程，蛋白质被指引着进入质膜或进入胞外空间（见 4.2 胞吐途径概述）。一些蛋白质是基本型分泌（constitutive secretion），也就是它们合成后总是被运出细胞。另一些蛋白质，尤其是一些特化细胞合成的蛋白质，比如那些消化酶，只有当细胞受到合适的刺激时才会释放。

蛋白质一旦进入内质网，就会一直停留在膜上或腔中直到被膜泡运送到系统的其他部位或返回胞质溶胶降解。运输小泡都是很小的膜球（典型的是 100～200nm），通过膜出芽形成，如图 1.27 所示（见 4.4 膜泡介导的蛋白质运输的概念）。运输小泡从一层膜的表面形成，出芽，然后运动到另一层膜表面与之融合。这些膜泡叫做**有被小泡（coated vesicle）**，因为膜外有蛋白包被（protein coat）包围。不同种类的膜泡可以由它

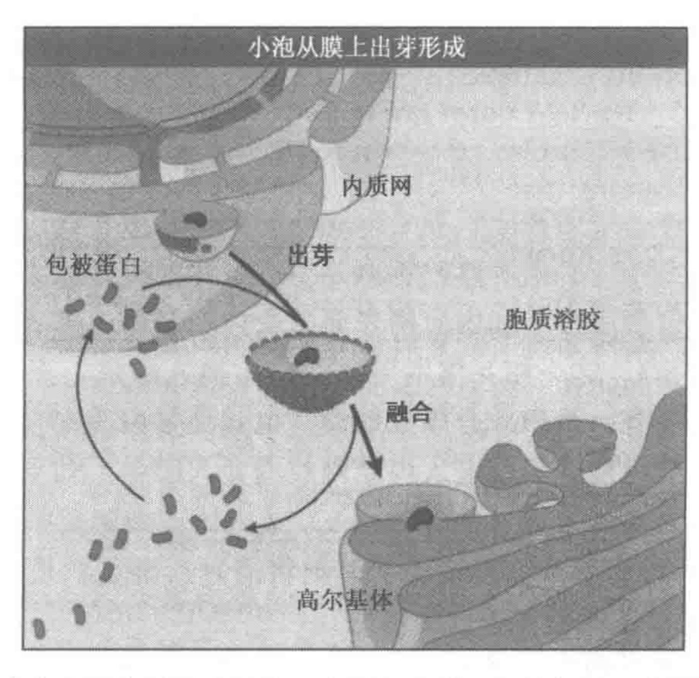


图 1.27　当含有蛋白质的小泡从一个隔室出芽，随后与另一个隔室融合时，蛋白质即在膜包围的隔室之间运输。

们的包被进行区分，包被负责膜泡所携带蛋白质的靶向运输（targeting）和选择。可溶性蛋白在膜泡腔内从供者膜运送到受者膜，膜蛋白也被携带在小泡的膜中。通过这种方法，蛋白质可以从内质网运送到高尔基体，穿过高尔基堆，到达细胞质膜。

蛋白质输入细胞也要使用有被小泡，膜泡在质膜处形成，进入细胞，这叫做**胞吞(endocytosis)**（见 4.3 胞吞途径概述）。胞吞的原则和胞吐（分泌）相似，只是通路行进方向相反。（从质膜）出芽的膜泡用来从胞外环境内化物质，并从质膜回收物质。用于胞吞的小泡和用于胞吐的小泡在蛋白包被（protein coat）上不同。一些病原体利用胞吞作用进入宿主细胞，的确，线粒体和叶绿体也可能起源于胞吞事件（见 1.9 细胞中的细胞：有包膜的细胞器可能来自于内共生）。

图 1.28 总结了新合成的蛋白质沿分泌途径外运和通过胞吞途径输入蛋白质在机制上的相似。在每种情况下蛋白质都要经过一系列出芽和融合事件，从一个膜表面转运到另一个膜。

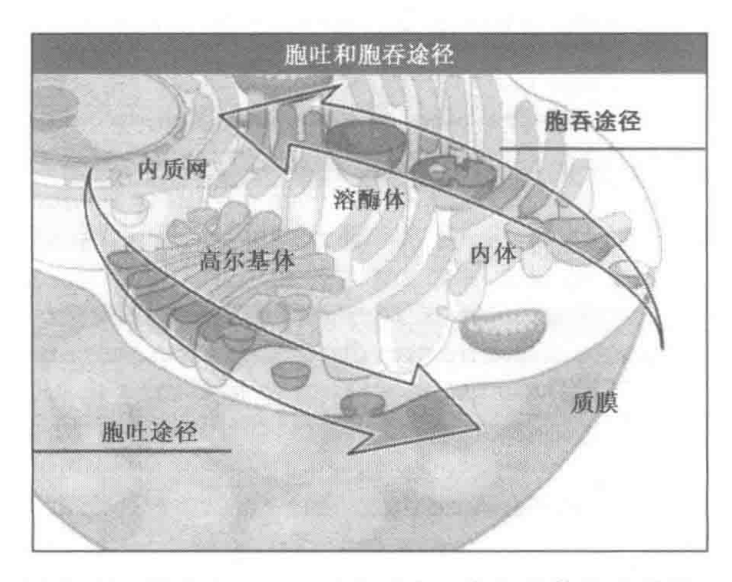


图 1.28 运输小泡运送蛋白质穿过高尔基体和内质网。

这个过程的一个结果就是当接连的出芽和融合事件发生时，膜成分从一层膜到另一层膜连续运动。从数量上说，分泌过程要比胞吞过程多，前行运输（anterograde transport）导致了脂质从内质网向质膜的净流动。空膜泡可能通过逆行运输（retrograde transport）将脂质返回到通路的上游。实际上，这造成了运输系统中膜的连续性。

蛋白膜泡运输是一个高度选择性的过程。基本原则是蛋白质按其拥有的特异信号被选择（大多数是短氨基酸信号）包入膜泡运入下一个隔室。如果没有这个信号，蛋白质就会停留在它已到达的隔室或者运动极其缓慢。出芽的小泡能选择性地合并需要运输的蛋白质，留下细胞器驻留蛋白。

1.17 蛋白质折叠与解折叠是所有细胞的基本特性

关键概念

- **蛋白质构象是初级序列决定的，但常常不能自发折叠，需要蛋白伴侣的协助。**

蛋白质的活性是由它的三级结构决定的。典型的，酶都有自己的活性位点，催化反

应在此发生。合并到寡聚体中的结构蛋白都拥有和其他亚基或其他有特殊功能的普通结构相互作用的位点。不论是哪种情况，蛋白质能折叠成正确的结构都是至关重要的。这一点很少能自发完成，常常要求这个蛋白质在合成的时候和其他蛋白相互作用。即使能够自发折叠成正确构象，这样的反应也过于缓慢，对活细胞没有用，而需要协助。帮助其他蛋白质折叠的蛋白质叫做**蛋白伴侣（chaperone）**，或称分子伴侣。

蛋白质中有一些结构不暴露在成熟构象中——特别是一些经常聚集在成熟蛋白构象中心的疏水区——但在合成期间暴露，蛋白伴侣能将它们识别出来。当蛋白质合成时，它作为一条线状氨基酸链存在于核糖体上，蛋白伴侣就会识别那些有聚集潜力的区域。通过与这些区域结合再释放，蛋白伴侣阻挡了蛋白链内不适当的相互作用，使其折叠时只循着唯一的一条道路，达到要求的构象。

在需要时，蛋白伴侣也帮助细胞处理受损的物质。比如当一个蛋白质因为过度受热被破坏了，它的构象发生变化，暴露了合成时就能被蛋白伴侣识别的同类区域（典型的是疏水区）。现在这些区域就能被用来辨别受损蛋白质，蛋白伴侣标记它们以供降解。

蛋白伴侣在所有隔室中都有。在胞质溶胶中，它们协助新生的蛋白质在合成时正确折叠。在细胞器的腔中，它们在蛋白质穿膜易位时辅助折叠。

（蛋白质伴侣分子的细节见第 3 章蛋白质的膜定向转移）

1.18 真核细胞的形态是由细胞骨架决定的

关键概念

- 真核细胞骨架是一种内部纤维框架，包括微管、肌动蛋白纤维和中间纤维。
- 它为许多活动提供了组织模板，包括细胞器的锚定。

细胞骨架（cytoskeleton）这一术语描述的是大多数真核细胞中都存在的纤维框架。它们构建成一个更坚固的内部结构决定着细胞形状。例如，上皮细胞是立方形的，而神经元有极端延伸的、非常细小的轴突。除了提供结构外，细胞骨架还有几项功能。比如底物蛋白可以通过蛋白马达（protein motor）附着到细胞骨架上，利用细胞骨架纤维作为导轨，将底物蛋白移动到细胞的特定位置。

细胞骨架是一种动态结构，由三种纤维系统组成。每种纤维都是由蛋白亚单位重复相互作用形成的多聚物。纤维是动态结构，因为亚单位可以通过“踏车”行为从纤维一端添加又从另一端减去。这三种系统是**微管（microtubule）**、**肌动蛋白纤维（actin filament）**和**中间纤维（intermediate filament）**。

微管是微管蛋白（tubulin）的多聚体，微管蛋白是两种紧密相关的蛋白，α- 微管蛋白和 β- 微管蛋白，组成的二聚体。它们形成一种直径约 25μm 的中空管。微管在本质上是不稳定的，须通过与其他蛋白质的相互作用达到稳定。它们对维持细胞结构是很重要的，解聚微管的药物能导致细胞丧失形态塌缩成球形。微管的解聚会导致在细胞核周围的内质网崩解，高尔基器碎裂成片，这说明微管在维持这些细胞器的结构方面有重要的作用。

在成纤维细胞和神经细胞的极端例子中可以看到细胞结构的多样性是由微管决定的。成纤维细胞是运动型细胞，能在机体内部移动。微管从核周围的一点呈星状辐射，

如图 1.29 所示。相比之下，从神经元胞体射出的轴突和树突是由平行的微管束延伸出来的，微管贯穿全长，如图 1.30 所示。它们是二者的结构元件，为延伸提供张力，可以用作轨道，马达分子沿着它运输蛋白质。

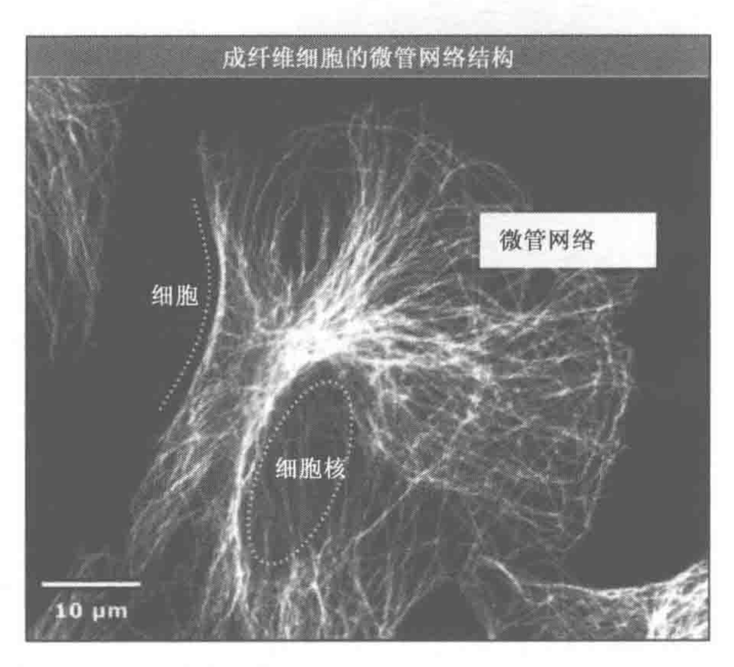


图 1.29 成纤维细胞微管荧光染色的显微图像。标出了细胞核和部分细胞膜的位置。照片获得 Lehigh 大学 Lynne Cassimeris 的许可。

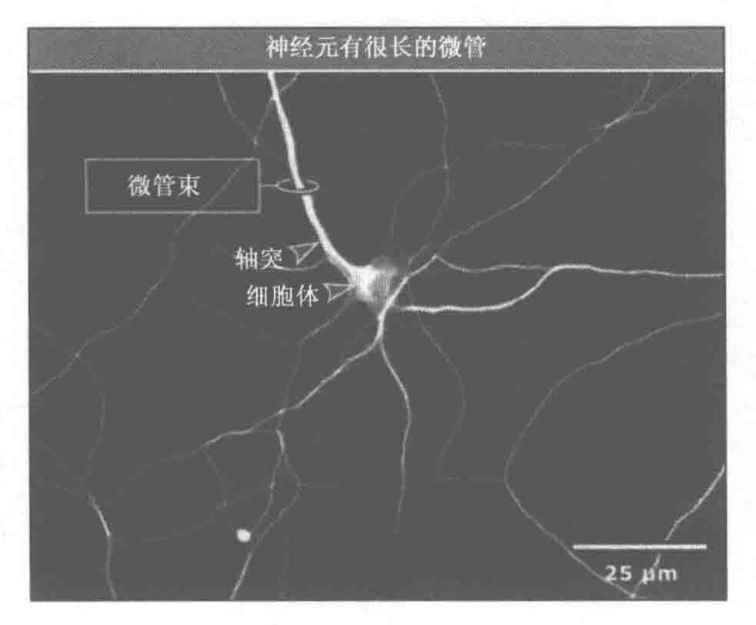


图 1.30 神经元的延伸的突起中有很长的微管。照片获得 Whitman 大学 Ginger Withers 的许可。

每当细胞分裂时，随着完全的重组发生，微管经历着组构方面的剧烈变化。图 1.31（见图版）显示了有丝分裂的重组过程，微管网络完全解聚，由纺锤体取而代之。

肌动蛋白纤维是由肌动蛋白亚单位组成的。肌动蛋白是真核细胞中含量最丰富的蛋白质之一，在进化过程中高度保守。所有的肌动蛋白亚单位在纤维中都有相同的极性，

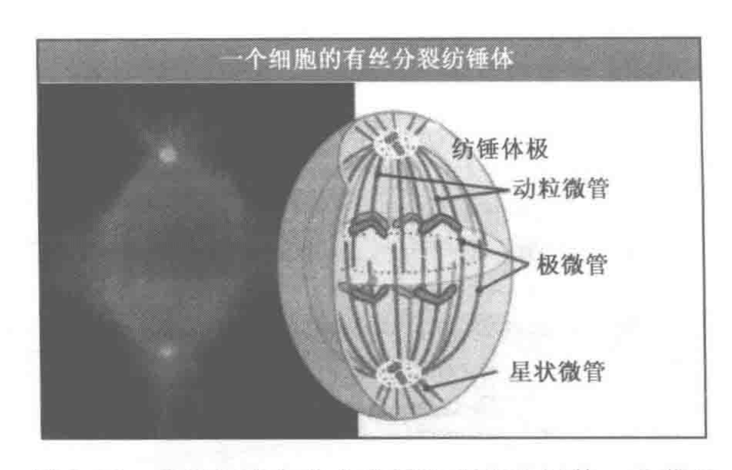


图 1.31　分裂细胞中有由微管形成的纺锤体。在荧光显微图中，微管、染色体和中心体区域分别染成绿色、蓝色和黄色。照片获得 Cambridge 大学 Christian Roghi 的许可。

一端带有 ATP 结合位点，与下一个亚单位接触。肌动蛋白纤维是一种亚单位二聚体的多聚物，亚单位呈念珠状排成两行，相互盘绕，形成直径约 8nm 的螺旋线。

除了贯穿细胞，肌动蛋白纤维还延伸到特化的结构中，从细胞表面伸出帮助细胞运动。图 1.32 展示了成纤维细胞中的肌动蛋白网。这种运动是机械功，由 ATP 水解提供能量。纤维的聚合驱动了这种运动，这对于多细胞生物和单细胞生物的细胞都是基本的特性。

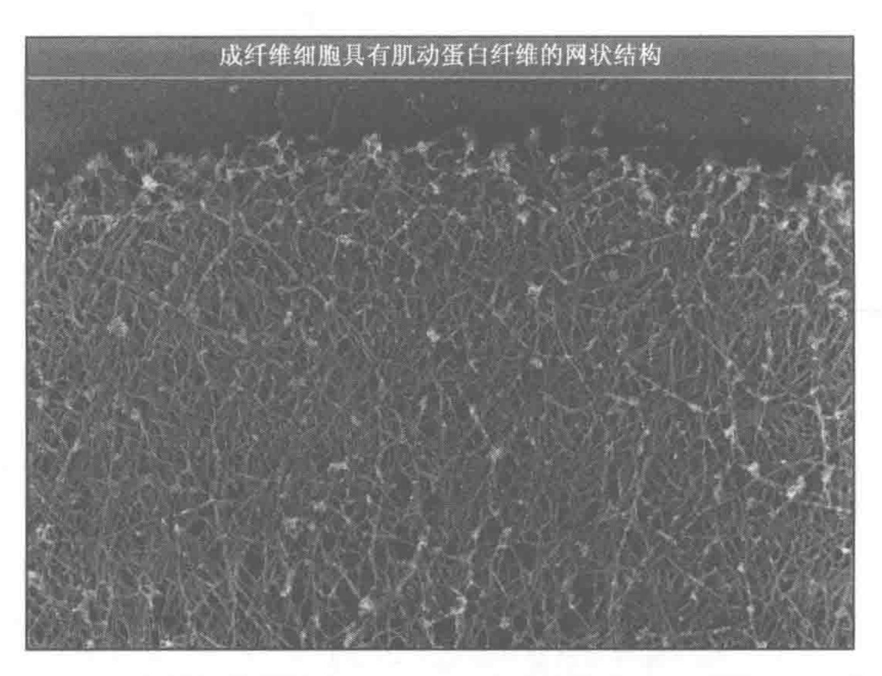


图 1.32　电镜显微图展示了成纤维细胞边缘肌动蛋白纤维的网状结构。照片获得 Pennsylvania 大学 Tatyana M. Svitkina 的许可。从 Motta，P. M. *Recent Advances in Microscopy of Cells, Tissues, and Organs* 复制。© 1997 by Antonio Delfino Editore—Roma。

1.19 细胞结构定位的重要性

关键概念

- 细胞中特定结构在特定位置的定位是细胞遗传信息的一部分。
- 位置效应在早期发育过程中是十分重要的。

细胞含有**位置信息（positional information）**：特定构造定位在特定位置。这在一些分化的细胞中尤为明显。例如在**极性细胞（polarized cell）**中，细胞两侧不同，物质以特定的方向选择性地穿越细胞。

新结构的组织依赖于先前存在的结构的方位。20 世纪 60 年代一项早期的研究通过原生动物草履虫展示了这一联系。图 1.33 展示了卵形的单细胞生物在表面有成排不对称的纤毛。纤毛的方向可以用实验颠倒，采用技术使两个细胞相接触会引起其中一个细胞的纤毛方向颠倒。被颠倒的样式可以由细胞分裂产生的子细胞继承下来。对样式(pattern）的反应性是微管在基体上组装形成纤毛过程中的特性，但蛋白质亚单位的结构并没有发生变化。

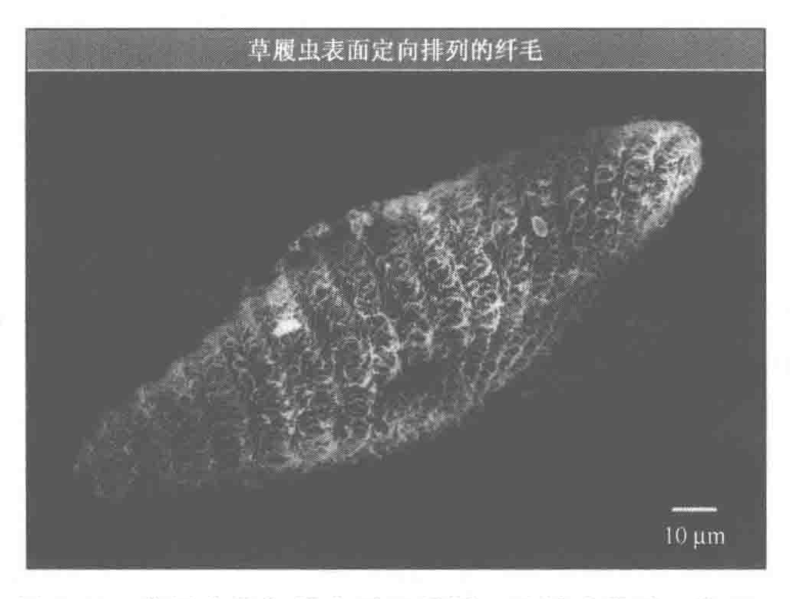


图 1.33　草履虫的扫描电子显微图，示纤毛排列。从 *The Journal of Cell Biology*，1972，vol. 55，pp. 250-255 复制，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

位置效应通常和微管有关。另一种由微管组成的结构就是中心粒（centriole），在大多数真核细胞中都存在。中心粒是小的蛋白质类结构，在 MTOC（微管组织中心）附近，MTOC 在细胞的两端形成了极，纺锤体微管在此终止。图 1.34 显示了新的中心粒总是垂直于已有的中心粒生长，可能是通过某种模板机制。这说明中心粒不能从头合成，只能发源于已有的中心粒。这意味着中心粒携带着一些不直接由 DNA 携带的，必要的遗传信息，具有明显的与 PrP 蛋白类似的表观遗传效应（见 1.10 DNA 是细胞的遗传物质，但是还有其他形式的遗传信息）。

位置差别也可能是在卵（egg）细胞中开始的。例如在果蝇的卵中沿着前后轴（an-

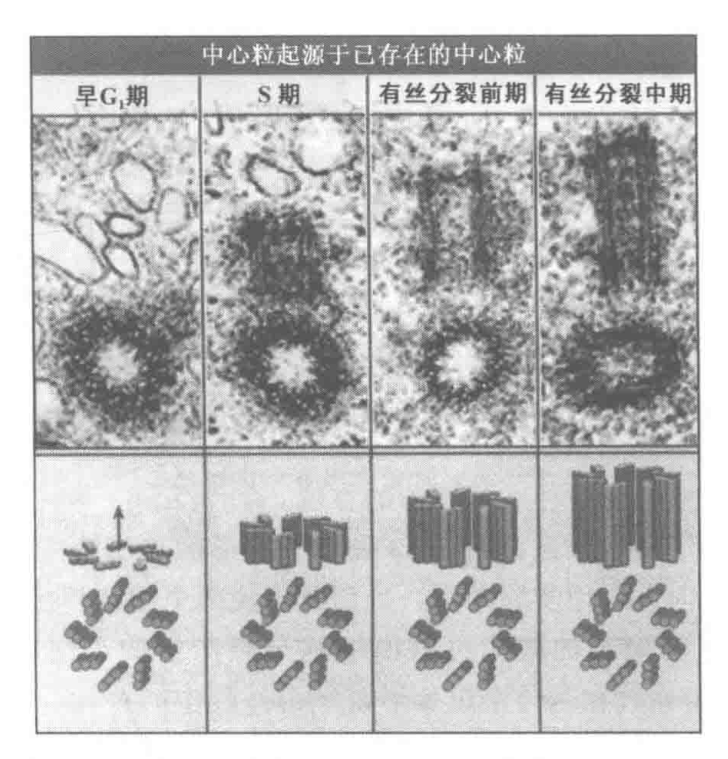


图 1.34　中心粒的发生是以已经存在的中心粒作模板。照片获得 Calgary 大学 J. B. Rattner 和 S. G. Phillips 的许可。从 *The Journal of Cell Biology*, vol. 57, pp. 359-372 复制，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

terior-posterior, front to back）和背腹轴（dorsal-ventral, top to bottom）都有蛋白质梯度。图 1.35 显示这些梯度都是由卵母细胞（pocyte）周围的滋养细胞造成的，它们对早期发育的控制是必不可少的。卵发育为成年雌性后又重建了这一系统，每个卵母细胞都由滋养细胞包围，造成了位置不对称效应。因此每一代的位置信息都要在下一代中重建，可以看作是生物遗传信息的重要组成部分。

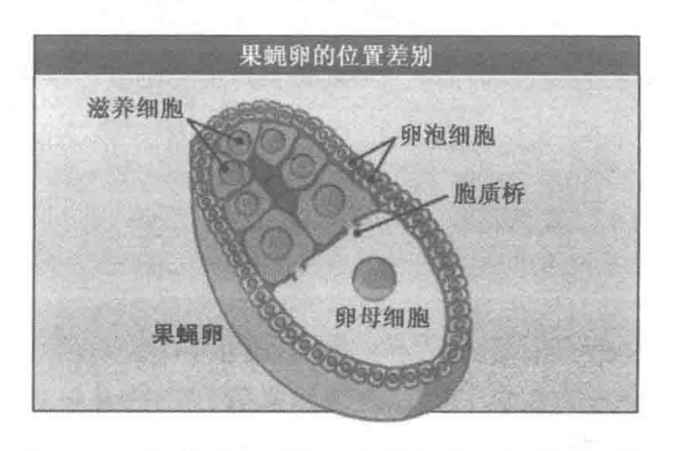


图 1.35　滋养细胞围绕着卵母细胞，负责向它输送物质，造成了一种不对称的形式。

1.20 信号转导通路实施预定的反应

关键概念

- 细胞外的事件能够通过包埋在细胞膜上的受体蛋白激发细胞内的反应。
- 跨膜的受体在膜的内部和外部都有结构域。
- 配体结合在外部结构域时，受体被激活。
- 配体的结合引起内部结构域的结构或功能改变。

对外界作出反应的能力是每个细胞都具备的基本特质。对单细胞生物来说，外界就是外部世界环境。对外的反应可能是简单地输入可用的营养物质，或者是向着食物来源迁移这样的复杂反应。对于多细胞生物来说，环境可能是由其他细胞缔造的，细胞之间交流的能力就变得十分必要，特别是当细胞需要依靠与其他细胞的相互作用发挥特殊功能的时候。

分子跨过质膜的物理运动不是细胞对外界反应的唯一方式。**信号转导（signal transduction）**使得膜外的事件能激发细胞内的反应。这一机制还能使信号放大来激发细胞预先确定的反应，如图 1.36 所总结的。

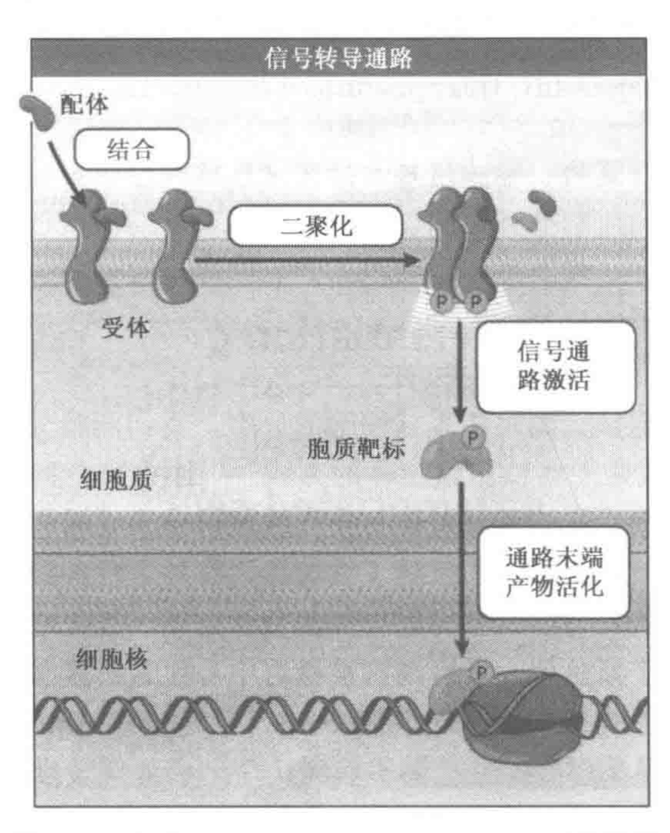


图 1.36 细胞表面的配体-受体结合激发了信号转导通路，产生特异的反应。

所有的信号转导通路的共同特点是环境中的一种组分会被细胞质膜中的蛋白质识别。环境中的激发物叫做**配体（ligand）**，质膜蛋白叫做**受体（receptor）**。受体跨过质膜，在胞外一侧结合配体引发的变化活化了胞内部分的功能。配体结合的一个共同反应是导致受体单体二聚化，二聚物的形成促成了酶的活性。酶作用在一些其他成分上，这

些成分又转而作用于它们的底物，整个链式反应接连发生。最终，通路的末端产物被激活。反应能在一些或所有步骤中得到放大，因此一次信号配体和受体结合的事件就会形成多个拷贝的终产物。终产物能使基因表达改变或细胞结构变化。

反应的性质与细胞活动形势相适应。当细菌识别附近的营养物质时，营养和受体相互作用导致信号转导接连发生，进而引起鞭毛运行改变，以便菌体向着食物源推进。当一个交配型的酵母识别了另一个交配型细胞分泌的多肽外激素（pheromone）时，信号转导激发的反应使两种细胞以一种极化的方式相向生长并最终融合。

在多细胞生物中，信号转导通路可能与产生相应的生理反应有关。当哺乳动物进食时，血流中糖含量升高。糖激发胰岛细胞中的信号转导，引起细胞分泌多肽激素胰岛素(insulin)。胰岛素又大范围地结合各种细胞的受体，激发一种通路使细胞吸收血流中的糖分。糖以糖原的形式被储存，为生物体提供能源。

1.21 所有生物都有能进行生长和分裂的细胞

关键概念

- 最简单的分裂方式是像一些细胞器那样的膜内陷方式。
- 细菌分裂时常常产生一个横跨细胞的坚硬隔膜，有如细胞壁的延伸。
- 有丝分裂时，真核细胞发生大范围的重组，形成纺锤体这一特殊结构，将染色体分隔到两个子细胞中。

为了确保能够进行繁殖，细胞最基本的要求是体积加倍后能一分为二。遗传物质的两份拷贝被一种特殊的机制分开，确保每个子细胞含有一份拷贝。其他成分按照它们在胞质中的分布随机分开。对真核细胞来说还需要复制内部的隔室，这样才能分配到子细胞中。这个过程既有隔室解散成组成成分，随后分配到两个子细胞中重新组装；又有亲代隔室实体的分裂，类似于细胞本身的分裂。

如果我们总结细胞器、细菌和真核细胞的分裂，我们能将分裂机制分为三大类。

最简单的分裂形式是一些细胞线粒体的方式——膜内陷，类似于细胞出芽过程中的膜内陷。图 1.37 显示了这一过程是怎样将亲代线粒体分裂成两个的（见MBIO：1-0008）。这可能是分裂机制的最古老形式，反映了线粒体起源的古代细菌的分裂方式。

细菌和古菌通常依靠与细胞壁构建相关的分裂方式。首先它们要确保在细胞相反的两极各有一份拷贝的子染色体，之后细胞被横跨中心生长的膜和细胞壁分隔开。大多数情况下，一个共同特征就是使用分裂蛋白 FtsZ，但是也有这样的例子，其中必须用到某些其他分子设备（见MBIO：1-0009）。

真核细胞经历了一个复杂的重建过程，包括核解体，染色体被等量地分配到细胞相对的两端，分离而进入两个子细胞，细胞结构重新形成。**有丝分裂（mitosis）**最共同的形式就是核解体，使隔室化的细胞结构被单一的结构纺锤体代替；分离的染色体变得紧密，然后附着在一个可移动的装置上，姐妹染色单体由此被定位到纺锤体赤道的两侧。这一过程在演变时，其重大阶段可能是染色体获得结合到分裂装置上的能力。这一装置承担细胞分裂的机械结构，此外真核细胞还有控制细胞周期的方法，那就是决定是否分裂和什么时候启动一次分裂。

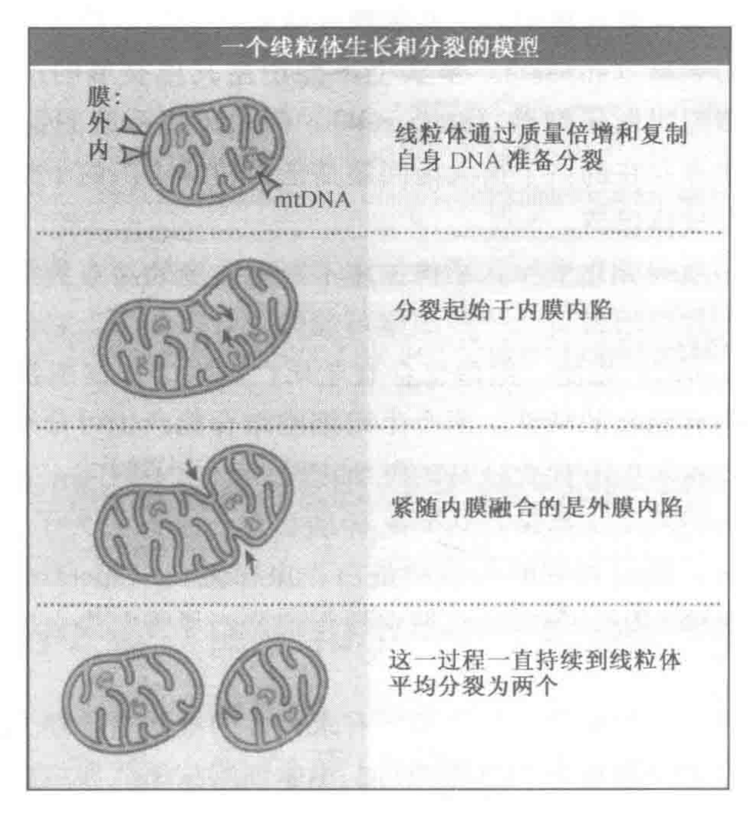


图 1.37　线粒体膜内陷将亲代隔室分隔成两个子代隔室。

1.22　分化产生了特化的细胞类型，包括终末分化细胞

关键概念

- **多细胞生物由很多不同类型的细胞组成，它们被特化而具有特定的功能。**
- **很多分化的细胞都失去了分裂和产生不同类型细胞的能力。**
- **干细胞具有产生很多不同类型细胞的潜力，这些细胞类型是构建一个生物体或生物的组织所必需的。**

先前在定义细胞的时候，我们描述了它的一个性质，就是能够分裂产生自我的拷贝的能力。这对所有单细胞生物来说都是正确的，然而在多细胞生物中，细胞的特化使这一观念有所变化。**分化（defferentiation）**描述的是这样一个过程，细胞获得新的表型或产生表型不同于亲代的后代细胞。

生物的**发育（development）**是这样一个过程，最初的单个细胞（在哺乳动物中就是受精卵）通过连续的细胞分裂成为一个由多种不同类型细胞组成的生物。受精卵是**全能的（totipotent）**：它能产生机体的所有细胞。发育可以看作是对后代细胞能力的连续限制过程，以便它们只能产生身体的特定细胞。

带有特化组织的多细胞生物的存在使我们有必要区分两种类型的细胞。**体细胞（somatic cell）**是生物体中除去**生殖细胞（germ cell）**外的所有细胞。体细胞在生物体中是为了特殊功用而特化的，对未来的下一代没有贡献。在哺乳动物中，它们是双倍体的（带有父方和母方各一套遗传信息）。下一代的产生是通过形成专门的生殖细胞完成的。生殖细胞对每种性别是特异的，是单倍体，每个精子和卵细胞都有一套遗传信息。

在成年生物的个体发育过程中，一些细胞保持着产生所有特殊组织细胞的能力，其他的只能产生细胞的亚群（subset），事实上不能产生其他类型的细胞。在更新中，带有广大的能动性的细胞叫做**干细胞（stem cell）**。例如免疫系统的细胞是从免疫干细胞传下来的。在生物学界存在的一个重大的问题是任何特殊组织的干细胞究竟是只存在于发育过程中还是能被成体保留。

组织发育需要一系列分化事件，子代细胞不断地改变表型直到最终产生了所有需要的细胞类型。在这个过程的最后，一些细胞可能失去分裂能力，它们被称为**终末分化的（terminally differentiated）细胞**。细胞也会衰老死亡。很多体细胞是终末分化的，生殖细胞也是，尽管它们有独自的特性：两个生殖细胞结合能产生可分裂的合子（zygote）。

一些终末分化细胞可以有如此极端的性质以至于引发了疑问，它们是否真的符合细胞的定义？哺乳动物血液红细胞分化达到这样的程度，它们丢失了细胞核，只剩下膜，它包围着血色素溶液，膜由内部的的肌动蛋白、血影蛋白（spectrin）网支撑。因为红细胞来自于功能完全的细胞，所以我们把它看作细胞，尽管它失去了几乎所有的常规定义特征。

常常有这样的争论，即细胞分化是否带有永久性的细胞遗传能力改变？或者说这种表型发育上的限制是否单独地是表观遗传的？将体细胞核植入卵细胞实现的克隆生物的能力发展明确地回答了这个问题：生物体的几乎每个细胞都保持着支持发育所需的遗传信息（遗传物质已经改变的细胞属于例外，比如产生抗体的细胞；或遗传物质丢失的细胞也例外，如红细胞）。

参考文献

1.2 生命始于一种自我复制的构造

研究

Chen, I. A., Roberts, R. W., and Szostak, J. W., 2004. The emergence of competition between model protocells. *Science* v. 305 p. 1474–1476.

1.9 细胞中的细胞：有包膜的细胞器可能来自于内共生

综述

Brown, J. R. and Doolittle, W. F., 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 61 p. 456–502.

Lang, B. F., Gray, M. W., and Burger, G., 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* v. 33 p. 351–397.

1.10 DNA是细胞的遗传物质，但是还有其他形式的遗传信息

综述

Wickner, R. B., Edskes, H. K., Roberts, B. T., Baxa, U., Pierce, M. M., Ross, E. D., and Brachmann, A., 2004. Prions: proteins as genes and infectious entities. *Genes Dev.* v. 18 p. 470–485.

1.19 细胞结构定位的重要性

研究

Sonneborn, T. M., 1970. Gene action in development. *Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 176 p. 347–366.

连慕兰　译

第2篇　膜及运输机制

第 2 章　离子和小分子的跨膜转运

Stephan E. Lehnart 和 Andrew R. Marks
Columbia University，New York，NY

本章概要

2.1　导言

关键概念

- 细胞膜确定了不同组分的隔室。
- 生物膜的脂双层对于大部分的生物分子和离子通透性非常低。
- 大部分溶质通过转运蛋白穿过细胞膜。
- 离子和其他可溶物质的跨膜转运控制着电位和代谢功能。

生物膜是围绕细胞隔室的选择性渗透障碍。质膜把细胞内部同细胞外环境分开，在真核细胞中，额外的膜还把特殊的隔室（compartment）同胞质溶胶（cytosol）分开(图 1.9)。细胞各隔室之间，在膜的组分以及内环境方面有很大的不同。经过进化，细胞发展了各种机制来保持和调节每一个隔室的组分。维持这种跨膜的溶解物（solute）浓度是细胞内稳态（homeostasis）的先决条件，细胞有这种能力，为生存所必需的代谢过程维持一个相对稳定的内环境。胞质溶胶离子浓度的稳态调节还决定了细胞膜两边的相对渗透压，因此还调节了细胞体积。另外，这种快速短暂的跨膜离子转运速率的改变可以使细胞适应改变了的代谢环境，处理信息（像压力信号），把营养物质运进细胞或将代谢废物运出细胞。

因为脂双层膜内部是疏水的，所以极性的、亲水的、大的生物分子基本上都是不可透过的，如图 2.1 所示。那么，无机离子、带电荷的和可溶的分子怎样进出细胞，怎样以一种选择性的方式跨过细胞内的膜？我们现在知道跨膜蛋白协助它们从一个隔室转运到另一个隔室。运输蛋白停留在质膜以及细胞内细胞器的膜上，如内质网、高尔基体、内体（endosome）、溶酶体和线粒体的膜上。每种类型的膜上都有各自特定的转运蛋白，不同的细胞类型也是这样。在本章，我们将讨论转运离子和小分子物质（如葡萄糖）的膜转运蛋白。我们首先给出膜转运蛋白总的分类概述（见 2.2 通道和载体是膜转运蛋白的主要类型），然后再详细地讨论特定蛋白的功能和结构。我们还将考虑在一个细胞中，不同类型的转运蛋白怎样在生理活动中共同行使功能。在其他章节将讨论蛋白质（和其他大颗粒）跨膜转运进入细胞，以及在细胞内的转运情况（见第 3 章蛋白质的膜定向转移，第 4 章蛋白质在膜间的运输，第 5 章细胞核结构和运输）。

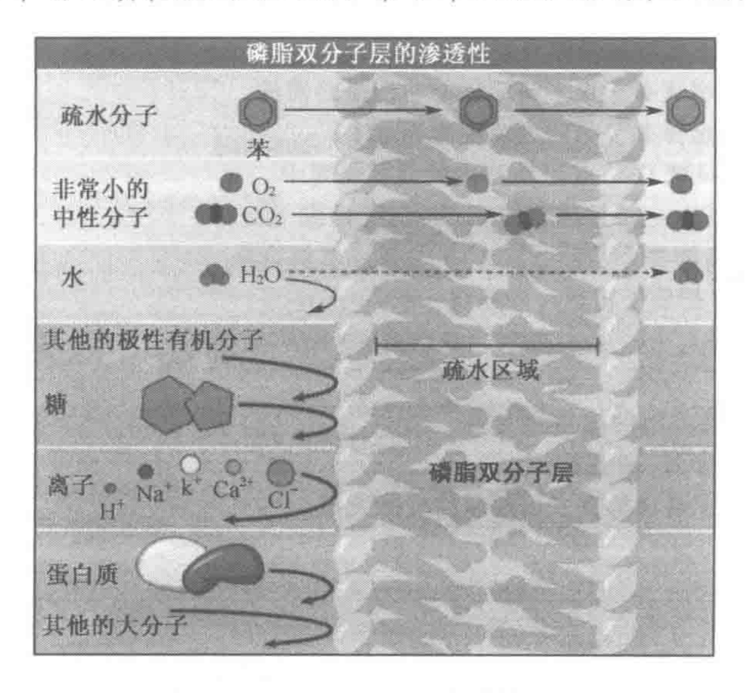


图 2.1　生物重要分子透过脂双层。

本章的大部分内容都涉及离子的跨膜转运。细胞利用膜转运蛋白（membrane transport protein）来维持细胞内离子浓度，它与细胞外离子浓度有很大不同，如图 2.2 显示了一个动物细胞中主要生理离子的种类。这些浓度差异的净作用使得静息的细胞中，细胞内侧相对于细胞外侧稍带负电。这些浓度和电荷的差异共同建立了**电化学梯度**

(electrochemical gradient)，细胞用它来储存电位能（离子和以离子为基础的膜电位的一些物理性质将在 2.3 离子的水合影响它们通过跨膜孔道的流动，2.4 跨膜的电化学梯度产生膜电位中介绍）。跨膜电化学梯度的调节使得大量的细胞基本功能，像能量产生、进出细胞的电信号的处理得以实现（见 2.19Na^+/K^+-ATPase 维持质膜 Na^+ 和 K^+ 梯度，2.20 F_1F_0-ATP 合酶将 H^+ 运动与 ATP 合成或水解耦联起来，2.12 动作电位是依赖几种离子通道的电信号）。

动物细胞内外的离子浓度

	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Cl^-
胞外浓度 (mmol/L)	145	4	1.5	123
胞内浓度 (mmol/L)	12	155	10^{-4}	4.2

图 2.2 哺乳动物骨骼肌细胞跨细胞质膜的离子梯度。图中标明了非水合离子的相对原子半径。

这里总结了研究膜转运蛋白的一些主要工具，在整章中都会提到。电生理手段检测跨膜的电荷流动（离子流），被应用到整个细胞或膜片段。这些技术允许测量调控的效应，如离子组成的变化，或额外的抑制物或激活物方面的变化。用天然毒素（蛇毒）抑制通道功能的方法鉴定和纯化了离子通道。这些毒素也被用作通道功能的探针。用重组转运蛋白、位点专一性诱变（site-directed mutagenesis）、纯化蛋白重构进人工膜和在异种细胞中表达转运蛋白的方法研究了结构和功能的关系。由于有能力解决一小部分转运蛋白在原子水平上的结构，我们对转运蛋白的理解进一步深化了。除了展示溶解物是怎样结合和透过膜，这些结构“快照”（snapshot）还向我们展示了跨膜转运蛋白的普遍模型。

2.2 通道和载体是膜转运蛋白的主要类型

关键概念

- 两种类型的膜转运蛋白：通道和载体。
- 离子通道催化快速和选择性地顺着离子的电化学梯度转运离子。
- 转运体和泵都是载体蛋白，逆溶质的电化学梯度转运时需要消耗能量。
- 在一个给定的细胞中，几种不同的膜转运蛋白作为一个整体工作。

一些转运蛋白在质膜上，而其他的分布在细胞内细胞器的膜上。为了保持细胞的组成以及细胞内的隔室，转运蛋白对特定种类的溶质具有选择性是十分重要的。根据转运模式的不同，膜转运蛋白可以被分为两类，**通道和载体蛋白（channels and carrier protein）**，如图 2.3 所示。通道蛋白包括一个孔道区域，当通道打开时，溶质可以高速通

过这个区域，而载体蛋白在膜的一侧结合溶质，要经过变构才能在膜的另一侧释放它们。

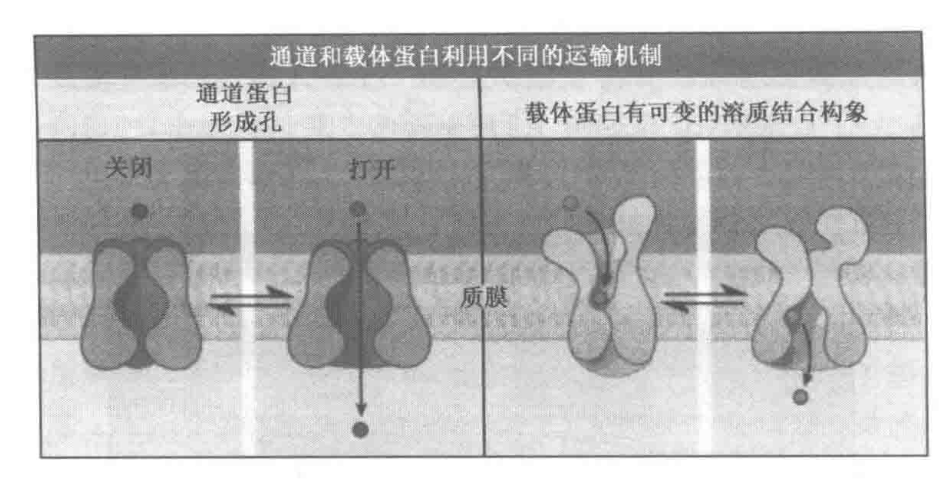


图 2.3 通道和载体蛋白是膜转运蛋白的两种基本类型。经由通道蛋白孔的溶质扩散，接近它们的最大扩散速率，而载体蛋白在膜的一侧结合溶质，经历构象变化，以相当低的速率在膜的另一侧释放它。

在膜上，有几种不同类型的蛋白质组成通道。在一些原核细胞、线粒体以及缝隙连接（gap junction）中有孔蛋白（porin），缝隙连接连接相邻细胞的细胞质，允许溶质主要基于大小通过（见 15.21 间隙连接允许相邻细胞间分子的直接传输）。更具选择性的通道的例子是核孔复合物和介导跨内质网膜的蛋白转移的通道（见第 5 章细胞核结构和转运和第 3 章蛋白质的膜定向转移）。在本章我们将讨论离子通道（ion channel）和水通道（aquaporin），这些通道各自催化离子或水分子高度选择性的跨膜运动。这样一来，将有 100 多种不同类型的通道蛋白被述及。通道蛋白有以下特征：

- 溶质选择性。
- 快速的溶质透过性。
- 门控机制调节溶质透过。

溶质从膜的一侧到另一侧所经过的通道蛋白被称做**通道孔（channel pore）**。有几种不同的通道构型。一些通道由单个蛋白质组成，这个蛋白质的跨膜部分形成一个孔道。其他通道是由相同或不同亚基组成的寡聚物共同形成一个孔道。还有一些其他的通道包含两个或多个亚基，每个都单独形成一个孔道。通常，寡聚通道复合物是由额外的亚基调控和定位到一个特定的膜上的。

大部分的通道蛋白对一些特定种类的溶质是高度选择性的，如 Na^+、K^+、Ca^{2+}、Cl^- 或水。其他通道蛋白是非选择性的阳离子或阴离子通道。在我们对特有的通道蛋白的讨论中，很明显的是，各个通道蛋白的孔道都有一个结构特征称之为选择性过滤器（selectivity filter），它使通道能区分不同的溶质。

溶解物（solute）的电化学梯度支配着通过通道的净离子流的方向。换句话说，溶解物是按顺能量的方向（energetically favorable direction），即顺着电化学梯度穿过通道运动的。例如，图 2.2 讨论的静息的细胞，将有通过 Na^+、Ca^{2+}、Cl^- 通道的内向电流和通过 K^+ 通道的外向电流。因为除了电化学梯度没有其他的能量来源，所以这种类型的转运被称为被动转运（passive transport）。通道蛋白有很快的传导率（conduction

rate)；对离子通道来说，测量到的速率可以达到 10^8/s，很接近水中离子扩散的最大速率。

膜转运蛋白是**门控（gating）**的，这些蛋白在应答特殊刺激时，通过构象（conformation）变化来打开和关闭通道，以此来控制各种不同的细胞功能。例如，离子通道可以是配体门（ligand-gated）、电压门（voltage-gated）、牵拉激活（stretch-activated）或温度激活的离子通道。离子通道可以很快地被激活，使其理想地处理信号。例如，神经信号依赖于细胞膜上离子通道产生的小电流。离子通道在调节细胞体积和细胞内 pH、通过上皮细胞的盐和水的转运、细胞内细胞器的酸化以及细胞内信息传递方面也很重要。

载体蛋白把储存在电化学梯度中的自由能、ATP 或其他能量转换，用于逆浓度梯度转运底物，因为有能量的利用，所以这种类型的转运叫做主动运输（active transport）。载体蛋白可以被分为两类，**转运体（tuansporter）**和**泵（pump）**，如图 2.4 所示。转运体耦联储存在电化学梯度里的能量来推进底物的跨膜运动。这些转运体又可以被进一步分成**单向转运体（uniporter）**、**同向转运体（symporter）**（也叫共转运体）和**反向转运体（antiporter）**（也叫交换器）。膜泵利用能量，如 ATP 水解释放的能量，直接驱动能量上不利的底物积聚或外流通路。与通道蛋白相比，载体蛋白的转运速率较低，每秒只能转运约 1000 个溶解物分子。

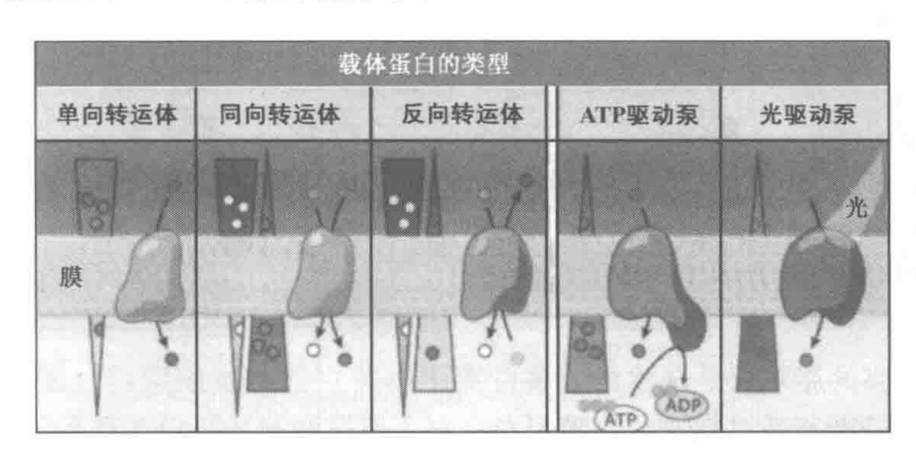


图 2.4　转运体和泵是载体蛋白的两种基本类型。单向转运体、同向转运体和反向转运体是三种类型的转运体。插入的三角图形描绘的是溶解物跨膜的电化学梯度。根据载体蛋白的不同，转运可以顺着梯度（从高到低）或逆着梯度。

有两种类型的主动运输，**主要的主动运输（primary active transport）**和**次要的主动运输（secondary active transport）**。介导主要主动运输的载体蛋白利用 ATP 作为能源来驱动溶解物逆着它们的电化学梯度运输。这样，这些蛋白质可以帮助维持跨细胞膜的溶解物的浓度梯度。Ca^{2+}-ATPase 和 Na^+/K^+-ATPase 泵是重要的介导主要的主动运输的转运蛋白，（见 2.18 Ca^{2+}-ATPase 把 Ca^{2+} 泵入细胞内的隔室中和 2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度）。介导次要主动运输的载体蛋白不直接利用 ATP。它们利用储存在电化学梯度中的自由能来驱动溶解物的跨膜转运，这个电化学梯度是由主要的主动转运蛋白创建的。因此，同向转运体和反向转运体介导的是次要的主动运输（见 2.15 同向转运体和反向转运体介导耦联转运）。图 2.5 总结了溶解物质转运的机制。

溶质运输的机制	
被动运输 顺电化学梯度 （不需要能量）	主动运输 逆电化学梯度 （需要能量）
扩散作用	膜泵或ATP酶
促进扩散 （通道运输、单向运输、耦联运输）	内吞作用
溶解性药物二次跨上皮细胞膜运输	

图 2.5　溶解物跨膜转运的机制可以被分为被动或主动两类。

在一个给定的细胞中，所有类型的膜转运蛋白——通道、转运体、泵——协调合作，以至于一种类型的转运蛋白功能的发挥需要依赖其他转运蛋白发挥功能。在本章中我们将通篇讨论几个这种相互依赖的例子。例如，跨细胞膜的离子梯度的维持需要几种转运蛋白复杂的相互作用。另外，像肾、小肠、肺中的上皮细胞正常发挥作用，也涉及很多离子和溶解物的转运。我们还会讨论到有缺陷的膜转运蛋白在各种疾病中所起的作用。

2.3　离子的水合影响它通过跨膜孔道的流动

关键概念

- 盐溶解在水中形成水合离子。
- 疏水的脂双层是水合离子跨过细胞膜的障碍。
- 通过催化离子部分脱水，离子通道得以快速、选择性地跨膜转运离子。
- 离子脱水消耗能量，而离子水合释放能量。

因为细胞膜的脂双层是疏水的，极性离子不能自己跨过细胞膜（图 2.1）。为了跨过细胞膜，离子必须通过特殊的跨膜蛋白：离子通道和载体蛋白。在本节，我们将会谈及溶液中一些离子的物理性质以及这些性质对离子转运的影响。

离子在溶液中是水合的（hydrated），就是说，它们被水分子包围。带正电荷和负电荷的离子都吸引着双极性的水分子，水分子的负电荷部分来自氧原子，而正电荷部分来自氢原子（见BIO：2-0001）。例如，离子水合是 NaCl 晶体迅速溶解在水中的基础。这个过程是顺能量的，因为水分子被自由的 Na^+ 和 Cl^- 吸引。

水分子层叫做**水化膜（hydration shell）**，它包裹着离子，因此可以部分地中和溶液中的电荷。这样，膜脂双层对于水合离子是一个高度有效的屏障。因为离子的水化从能量上是有利的（energetically favorable），而离子要脱掉其水化膜进入脂双层的疏水环境中，则需要相对大的能量。在跨膜离子转运过程中，离子通道帮助克服这个能量障碍。

水化膜的形成依赖于离子的大小和电荷。根据它们的电荷和大小，水偶极朝向阳离子或阴离子。与带有相同电荷的大的离子相比，较小的离子有更局限的电荷，具有更高的**电荷密度（charge density）**。更高的电荷密度导致更强的局部电场，会吸引更多的水

分子并且增加水化膜的厚度。这样，较小的离子与大的带相同电荷的离子相比，有更大的水化膜，当穿过通道孔时，有更大的有效半径。

为什么水化在离子转运过程中如此重要？离子通道产生一个与充水孔道（water-filled pore）相似的或模拟充水孔道的环境，这样当离子通过通道时，有利于其部分脱水。当离子穿过通道时，它与通道上带电荷的或部分带电荷的氨基酸残基形成弱的静电键，来替代或模拟特殊的水化膜，帮助转运过程既是能量有利的同时又具有选择性。离子通道的选择性有赖于对一种特定的离子，而不是其他离子，利用通道尺度和离子结合位点，以一种能量有利的方式催化其部分脱水的能力（这些概念的细节在 2.5 K^+ 通道催化选择性和快速的离子渗透中讨论）。

2.4 跨细胞膜的电化学梯度产生膜电位

关键概念

- 跨膜的膜电位的形成归因于跨膜的电化学梯度和膜对离子的选择性透过。
- 能斯特方程被用来计算作为离子浓度的一个函数的膜电位。
- 细胞保持一个负的静息膜电位，细胞内比细胞外稍带负电。
- 膜电位是电信号和指导离子跨细胞膜运动的先决条件。

细胞的一个明确的特征就是可以保持溶解物的浓度，这个浓度与细胞外环境中的浓度显著不同。对于离子而言，它们的跨膜浓度不同造成电荷差：细胞内的电荷比细胞外稍微负一点。电荷差和浓度差合起来称做电化学梯度（electrochemical gradient）。质膜上的选择性通道和载体蛋白使电化学梯度得以保持。

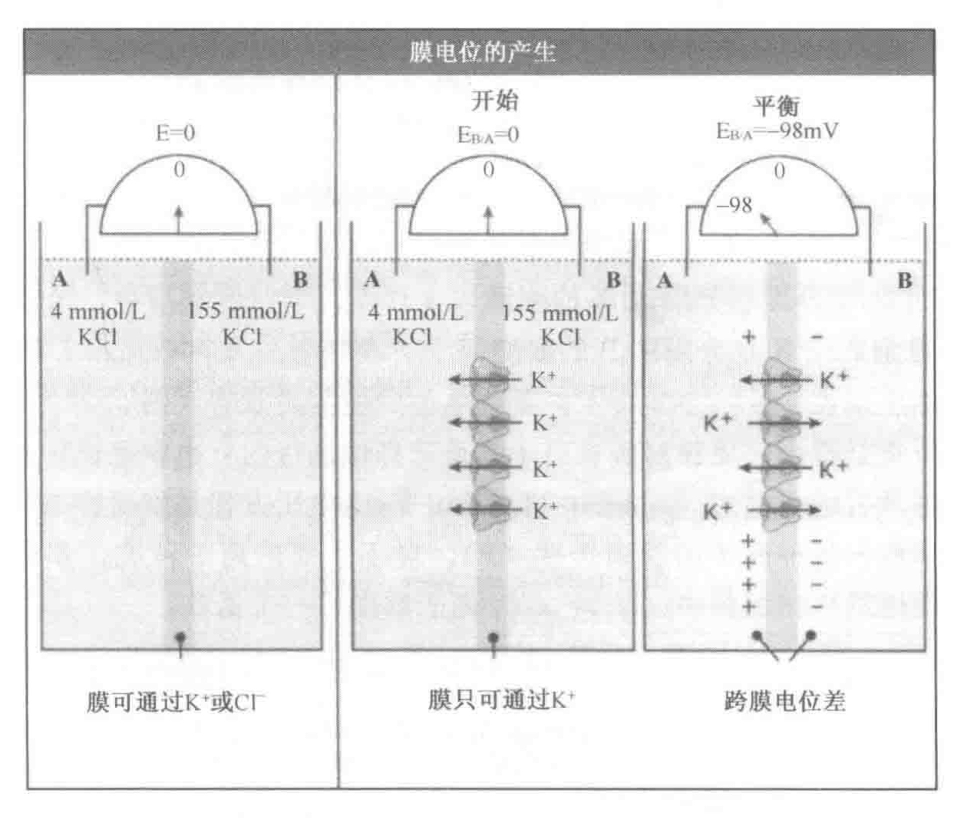


图 2.6 当离子被允许选择性地跨膜移动时，膜电位改变。

要理解怎样建立跨膜的电化学梯度，我们首先考虑一个简单的例子，即一种膜只允许一种离子透过，例如图 2.6 所示的两个分隔区 A 和 B，它们被一层很薄的膜分开。分隔区 A 和 B 含有不同浓度的 KCl，解离成水合的 K^+ 和 Cl^- 。因为每个分隔区都有等摩尔浓度的 K^+ 和 Cl^-，所以每一个分隔区都是电中性的。如果膜可以透过离子，那么，用电压计测量的话，跨膜的电化学梯度将会是零。

下一步我们将考虑膜仅可以透过 K^+ 的情况（例如，当膜上嵌有 K^+ 通道）（图 2.6）。溶解物顺着它们的浓度梯度扩散在能量上是有利的（表达为一个负能量差 ΔG）。因此，K^+ 将顺着它们的浓度（化学）梯度，从分隔区 B 扩散到分隔区 A，从而改变了跨膜的电荷分布。带正电荷的离子积聚在分隔区 A 中，相互排斥，这种排斥力将对抗 K^+ 从分隔区 B 向 A 的扩散。当这个系统达到它的电化学平衡时，浓度的力和电梯度的力精确地彼此平衡，因此没有 K^+ 的跨膜净移动。在这一点上，从一个分隔区来的 K^+ 移动抵消了从另一个分隔区来的 K^+ 移动。但是，分隔区 A 相对于 B 多一些带正电荷的离子。这些过量的 K^+（在 A 中）被过量的 Cl^-（在 B 中）吸引跨膜，以致电荷排列在膜的每一边。跨膜的电荷差导致电位差，也称做**膜电位（membrane potential）**。分隔区 B 的平衡（膜）电位相对于 A 的为负。这个例子说明细胞产生非零膜电位的两个必要条件：

- 膜的两边几种离子的浓度不同，导致电荷的分离，和
- 膜至少选择性地透过这些离子中的一种。

膜电位因此是离子浓度的一个函数。在平衡点，对于一种离子 X，这种关系可以用能斯特方程（Nernst equation）定量表达：

$$E_X = 2.3\frac{RT}{zF}\log_{10}\frac{[X]_B}{[X]_A}$$

E：平衡电位（V）

R：气体常数（2cal mol^{-1} K^{-1}）

T：绝对温度（K；37℃ =307.5K）

z：离子的（化合）价（电荷）

F：法拉第常量（2.3×10^4 cal $V^{-1}mol^{-1}$）

$[X]_A$：自由离子 X 在分隔区 A 的浓度

$[X]_B$：自由离子 X 在分隔区 B 的浓度

对动物细胞来说，K^+、Na^+、Cl^- 是膜电位的主要贡献者（图 2.2)。Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对静息膜电位贡献很小。质膜对所有离子都是选择性透过的（也就是说，膜含有的通道对每种离子都具有选择性)。Goldman-Hodgkin-Katz 电压方程是能斯特方程的详述，考虑到了其复杂性和每种离子的膜通透性（P）。对于主要的离子种类，方程表达为膜电位作为离子的通透性和细胞内（i）外（o）离子浓度的一个函数：

$$E = 2.3\frac{RT}{zF}\log_{10}\frac{P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o}$$

根据细胞类型，细胞保持一个跨质膜的负的静息膜电位，从－200mV 到－20mV。在哺乳动物细胞中，静息膜电位主要是来自于通过 K^+ 通道的转运和一个叫做 Na^+/K^+-ATPase 的离子泵。膜负电位的主要贡献者是一个小的 K^+ 流，是通过质膜 K^+ 渗漏

通道（leak channel）（也叫做静息 K^+ 通道）的 K^+ 流。与大部分其他的 K^+ 通道不同，K^+ 渗漏通道在静息膜电位的情况下是打开的，而其他的 K^+ 通道需要有信号才能打开。在静息的细胞中，其他离子很少有通道是打开的。K^+ 顺着它们的电化学梯度移出细胞，帮助细胞内比细胞外更呈负电性。我们不知道静息 K^+ 离子传导（conductance）的所有来源。在一些细胞中，如植物细胞和细菌，以及细胞器如线粒体中，静息膜电位的产生是来自于质子（H^+）梯度而不是 K^+ 梯度。

为了要通过 K^+ 通道扩散出细胞，细胞内的 K^+ 浓度必须比细胞外大。这个浓度梯度是由 Na^+/K^+-ATPase 保持的，它把两个 K^+ 泵入细胞的同时又把三个 Na^+ 泵出细胞。因此，泵出的净电荷要比泵入的多。除了 K^+ 渗漏通道，Na^+/K^+-ATPase 也帮助细胞内比细胞外有更多的负电荷。如果一个细胞的 Na^+/K^+-ATPase 失活，那么膜两侧的 Na^+、K^+ 的浓度最终会相同。这是因为脂双层对离子的透过性很低。换句话说，如果没有 Na^+/K^+-ATPase 作基础的主动运输，膜电位将为零。

静息细胞的膜电位是相对恒定的。但是当配基结合、机械压力或电压变化时，离子通道因做应答而打开，膜电位就会发生变化，这样增加了对某种特异溶质的透过性。在对电压敏感的离子通道情况下，膜电位的变化将影响经过通道的离子流动。离子通道打开和关闭的控制被称为**门控（gating）**。膜电位是由通道打开得最多的离子决定的。例如，当 Na^+ 或 Ca^{2+} 通道打开时，允许相应的离子顺着它们的电化学梯度流入细胞，发生膜**去极化（depolarization）**。这将导致膜电位更正。相反，当 K^+ 通道打开，允许 K^+ 顺着它们的电化学梯度移出细胞和导致更负的膜电位时，**膜复极化（repolarization）**（或者当比静息的细胞膜电位更负时，超极化）发生。这时，通过离子通道的离子运动很快，时间达到 1ms 级。改变膜电位仅仅需要跨膜离子浓度的微小差别，而大量的细胞内离子浓度基本不受影响。仅 10^{-12} mol/cm² 膜的 K^+ 浓度差别就能快速地使膜电位超极化（hyperpolarize）到 −100 mV。相对小的电荷跨膜局部移动允许胞质溶胶和细胞外液体保持电中性，并且把电荷斥力减到最小。

从能量的观点看，膜电位代表一种能量储存形式，能够随时用来进行工作。阴离子储存在质膜的胞质溶胶一侧，阳离子储存在质膜的细胞外侧时，质膜的功能类似于电容器或电池装置，储存电能并且在电路中被用来提供能量。离子顺着它们各自的电化学梯度移动释放能量，可以耦联到使其他离子或溶质逆浓度梯度的耗能转运（见 2.16 跨膜的 Na^+ 梯度对于很多转运蛋白的功能是必需的）。

（电化学梯度的细节见BIO：2-0002；能斯特和 Goldman-Hodgkin-Katz 方程见 2.24 补充：能斯特方程的推导和应用）。

2.5 K^+ 通道催化选择性和快速的离子渗透

关键概念

- K^+ 通道作为一个充满水的孔道，催化选择性的和快速的 K^+ 转运。
- K^+ 通道是由四个相同的亚基组成的复合物，每一个亚基组成孔道的一部分。
- K^+ 通道的选择性过滤器是进化上保守的结构。
- K^+ 通道选择性过滤器催化离子脱水，可以特异性地加快离子渗透。

钾（K^+）通道是质膜的内在蛋白（integral protein），介导细胞内外侧之间的 K^+ 流通。从细菌到人的整个进化过程中，K^+ 通道都是保守的，不同的细胞中的很多生物功能，从稳定静息膜电位到动作电位的终止，再到电解质平衡的维持，都有 K^+ 通道参与（相反，原核生物中的 K^+ 通道的生理功能还不太清楚）。与其他离子通道相似，K^+ 通道也是由不同的机制控制的：也就是说，对电或化学信号的应答指令 K^+ 通道打开或关闭（K^+ 通道门控的细节见 2.6 不同的 K^+ 通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制）。因为细胞内维持着比细胞外高得多的 K^+ 浓度（图 2.2），K^+ 通道的开放导致 K^+ 顺着它们的电化学梯度流出（K^+ 浓度维持的细节见 2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度）。

与其他的离子通道一样，K^+ 通道形成一个狭窄的充水孔，离子可以通过。K^+ 通道对 K^+ 要比对其他阳离子的选择性高。这种选择性对于维持细胞离子浓度是非常重要的。电生理的测量显示，K^+ 流通过通道的速率达到 10^8 个离子/s，这接近于水中溶质的最大扩散速率。在本节，我们将讨论这种选择性的快速离子通透的分子基础。

每个 K^+ 通道都是一个同源四聚体，四个亚基共同形成一个中央孔道，如图 2.7 所示。根据亚基的跨膜拓扑结构能够划分两种主要的 K^+ 通道。在 2TM/1P 类型的 K^+ 通道中，每一个亚基都有两个跨膜（2TM）的 α 螺旋，M1 和 M2，由一个孔（P）环（loop）分开。P-环包括一个短的螺旋区段叫做孔螺旋（pore helix）。所有的 K^+ 通道都有这些特征。2TM/1P 类包括向内整流器（inward rectifier）、KATP 和 G 蛋白耦联的 K^+ 通道（G protein-coupled K^+ channel）。其他主要的 K^+ 通道类型中，叫做 6TM/1P 的，每一个亚基都包括 6 个跨膜域（6TM）和一个 P-环。在这种类型的 K^+ 通道中，S5-P-S6 区域以一种与 2TM/1P 通道的 M1-P-M2 区域相似的样式形成孔通道。四个额外的跨膜片段（S1～S4）参与通道的门控。6TM/1P 通道类包括电压门 K^+ 通道（Kv 通道）和配体门通道，如 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道（电压门或 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道的细节见 2.6 不同的 K^+ 通道用一个相似的门控耦联不同的激活或失活机制）。

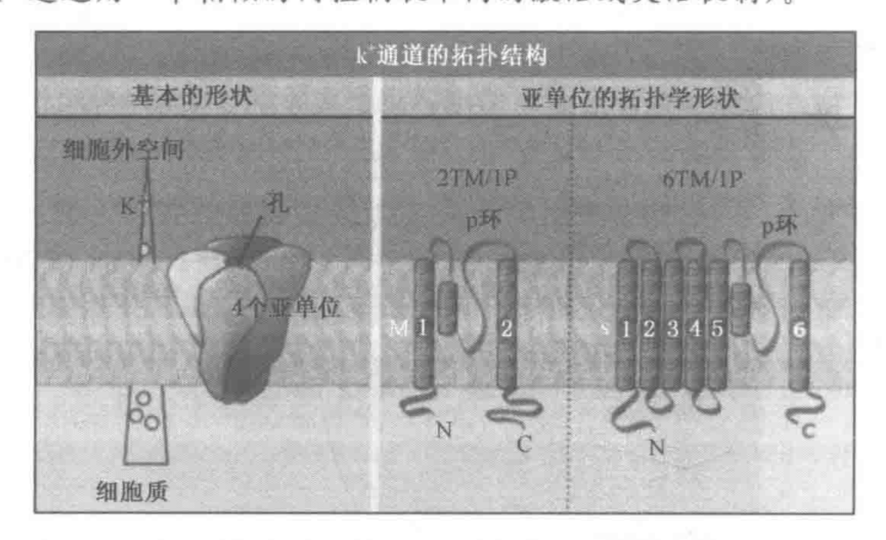


图 2.7 K^+ 通道是由四个相同的亚基组成的四聚体，每一个亚基都参与形成中央的孔道区段。两种主要的亚基类型是有两个跨膜域的亚基和有六个跨膜域的亚基。这两种类型都有一个孔-环。左边的图指明了动物细胞的静息 K^+ 梯度。

我们对选择性 K^+ 通道的理解来自于电生理和诱变实验以及 X 射线晶体分析。除了证实早先实验的推测，晶体分析提供了通道在原子水平的结构视图，使我们能探究通道的分子机制。有关 K^+ 通道的第一个晶体结构是细菌的 KcsA 通道，一个 2TM/1P 类型的通道，是其关闭时的构象。离子通过的孔道包括两个主要的部分——**选择性过滤器(selectivity filter)** 和中心腔室（central cavity），如图 2.8 所示。有 M2（内部）螺旋和 P-环沿着孔道排列。选择性过滤器是孔道最窄的部分，有 12Å 长，3Å 宽，每个亚基贡献一个 P-环给它。通道中可以看到六个含有离子的位点：选择性过滤器内的四个位点（P1～P4），两个其他的位点（P0 和 P5），一个在过滤器外侧的开口处，一个在中心腔室。这些位点代表来自于所有 K^+ 通道蛋白晶体结构图像的组合。

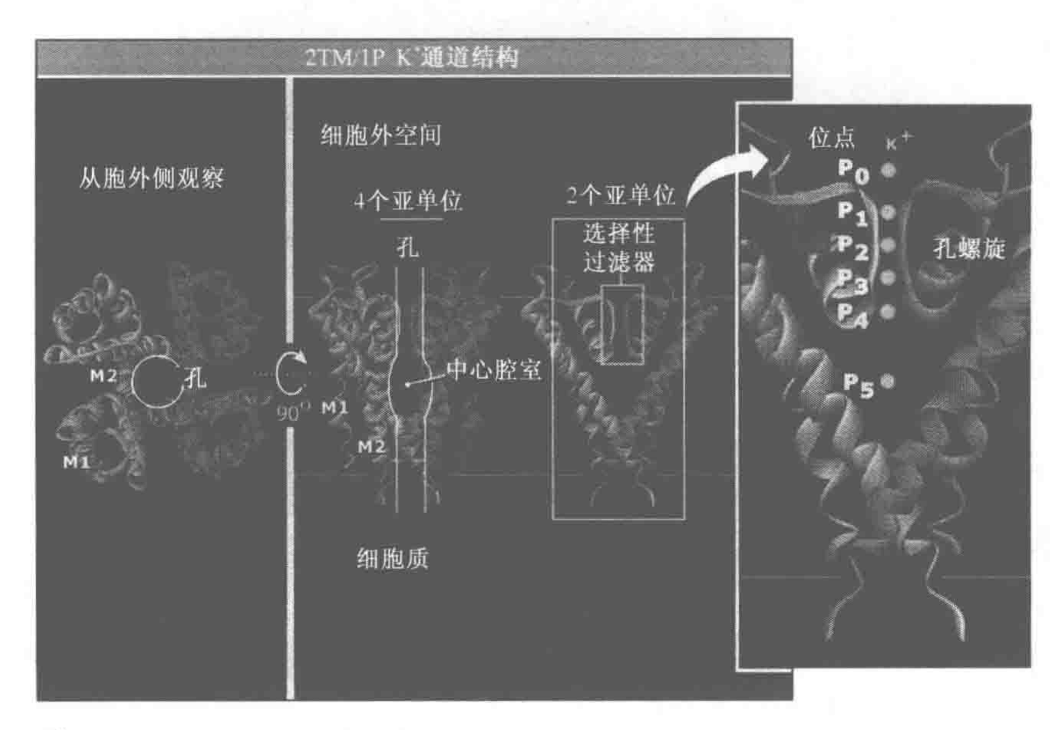


图 2.8 KcsA K^+ 通道的晶体结构，上面的带状物图描绘的是蛋白主链（protein backbone）。图中指示的膜的位置是推测位置。为清楚起见，右面的图形仅显示了两个亚基。图片来自于 Protein Data Bank file 1K4C。这个晶体结构是截短的 KcsA 通道，缺少一些氨基端和羧基端残基。

K^+ 通道选择性过滤器的四个 P-环，每一个都包含有一个高度保守的序列叫做标识序列（signature sequence）：Thr-X-Gly-Tyr-Gly 或 Thr-X-Gly-Phe-Gly（分别是 TXGYG 或 TXGFG），X 可以是几个氨基酸残基中的一个。在 KcsA 通道中，标识序列是 Thr-Val-Gly-Tyr- Gly（TVGYG）。这些残基中的每一个都可以指导一个羰基氧原子（可以来自蛋白主链或侧链）进入 K^+ 渗透通道，如图 2.9（见图版）所示。这些羰基氧原子（carbonyl oxygen）携带部分的负电荷，形成一系列由四个“笼子”（cage）构成的角落，协调正在透过的 K^+ 的位置。在过滤器中被协调的 K^+ 的位置像一条线状的链。

溶液中的 K^+ 是水合的，也就是说，它们被水分子包围。为了 K^+ 能进入狭窄的过滤器，水分子必须被去除。但是，离子脱水是需要消耗能量的，因为必须克服带正电荷的 K^+ 与带部分负电荷的水偶极之间的强大吸引力。K^+ 通道解决了这个问题，因为选择性过滤器的带部分负电荷的氧原子替代水分子，产生一个疏水环境，降低了渗透的

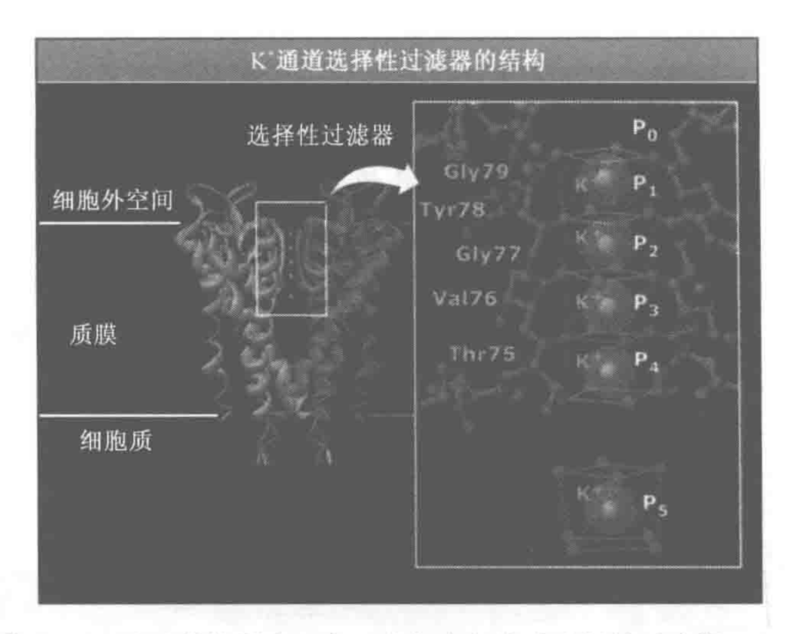


图 2.9 细菌 KcsA K^+ 通道的所有四个亚基都参与构成选择性过滤器（filter）。为清楚起见，图中只显示了两个亚基的孔环残基和来自其他两个亚基的孔环的相应的氧原子。P_0～P_5 是六个可能的 K^+ 结合位点。P_0 在孔道的朝向胞外开口处（没有显示 K^+）。选择性过滤器上的 P_1～P_4 位点，每个都是由来自 P-环的 8 个氧原子组成（来自 8 个水分子的氧原子用红色表示）。孔腔中心的 P_5 位点被水合 K^+ 占据。X 射线晶体结构的图片来自于 Protein Data Bank file 1K4C。这个结构图代表的是所有蛋白质晶体结构的混合形式，故所有位点都被 K^+ 占据。图中指出了膜的推测位置。

K^+ 的脱水能，并且模拟了形成的水壳的水偶极的弱负电荷。

脱水步骤是离子选择性的基础。考虑到另一种大量的单价阳离子 Na^+，其直径比 K^+ 小，而且比 K^+ 通道透过 K^+ 的速度要小 10^4 倍。K^+ 通道对于 Na^+ 实际上是完全不通透的，原因是 K^+ 通道选择性过滤器的大小补偿 K^+ 脱水的能量消耗，但是不能补偿 Na^+ 脱水的能量消耗。脱水的 K^+ 在选择性过滤器内非常适合，但是脱水的 Na^+ 太小，而不能在以能量有利的方式脱水时，协调与羰基氧的关系。这样，选择性过滤器的结构有利于 K^+ 而不是 Na^+ 通过。

为了使 K^+ 通道催化扩散的速率达到 10^8 个离子/s，通过选择性过滤器这个过程，离子部分脱水，然后必须在大约 10ns 内重新水化。根据不同的晶体结构分析，每一个结构都采用不同浓度的 K^+ 获得，并依据电脑模拟，提出了一个怎样达到高通量的模型。这个模型依据的观测是，在选择性过滤器中的 K^+ 在任何给定的时间点，既可以占据 P1、P3 位置（1、3-构型）也可以占据 P2、P4 位置（2、4-构型），如图 2.10 所示。提出这些构型已考虑到 K^+ 由于正电荷之间的斥力，不可能占据临近的位置。这两个构型在能量上是相似的，并且是彼此平衡的。当 K^+ 从中间腔室进入选择性过滤器时，静电斥力使离子以双占据构型中的任一个沿着过滤器移动。结果这个队列中，位于细胞外侧的离子被推了出去。之所以达到高传导，部分原因是在 1、3 和 2、4-构型之间的移动基本上没有能量障碍。

另外，促使离子快速透过的一个总体原则是，当通道打开时，通道孔能够宽到允许离子自由地通过，直到它们到达选择性过滤器。这样，在 K^+ 通道中，相对于膜的宽

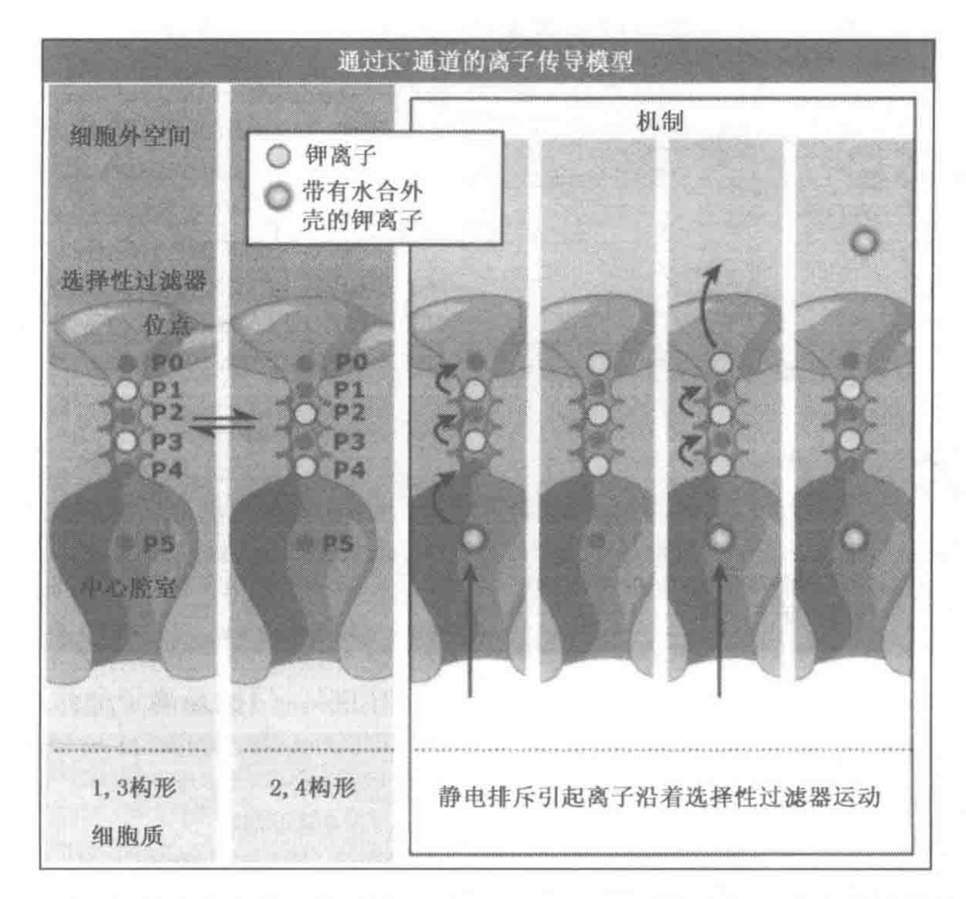


图 2.10　K^+顺着它们的浓度梯度，从质膜的细胞内侧运动到细胞外侧。这个模型预示，两个部分脱水的K^+在任何时候都占据着选择性的过滤器。这些离子在自由能相等的两种构型之间快速移动。进入的离子的静电斥力使离子通过选择性过滤器向前运动。这样，选择性过滤器消除了能量障碍，使K^+获得高通透性。

度，离子透过的有效距离被缩短到选择性过滤器的12Å长（K^+通道的细节见2.6不同的K^+通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制）。

K^+通道结构的另一个特征是在选择性过滤器的细胞内侧有约10Å宽的中心腔室。疏水残基沿着中心腔室排列，帮助减小水合离子与渗透通路之间的相互作用。同时，中

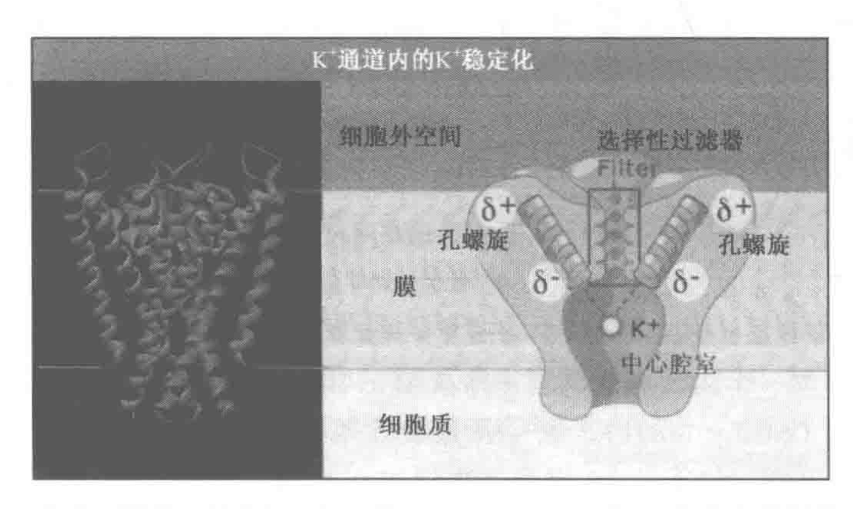


图 2.11　四个孔道α螺旋（绿色），它们的偶极负电荷指向位于孔道中部并稳定占据P5位点的K^+正电荷（为清楚起见，右面的示意图只展示了两个孔道的螺旋）。螺旋偶极的部分电荷已指明。晶体结构的图片来自于 Protein Data Bank file 1K4C。

心腔室还帮助 K^+ 克服来自于脂双层的疏水中心的斥力。中心腔室的两个特征帮助稳定处于膜中央的通道中的 K^+，膜中央离子渗透的能量障碍是最大的。首先，中心腔室保持 K^+ 被水分子围绕。其次，来自每个通道亚基的孔道螺旋令它们的部分负电荷朝向中心腔室的中央，如图 2.11（见图版）所示（α 螺旋的部分负电荷和部分正电荷来自于相临转角之间的疏水键，结果羧基末端比氨基末端带有更多负电荷）。

2.6 不同的 K^+ 通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制

关键概念

- 门控是离子通道的一个基本性质。
- 不同的门控机制界定 K^+ 通道的功能类别。
- K^+ 通道门不同于选择性过滤器。
- K^+ 通道受膜电位调节。

离子通道有两个基本性质，选择性离子传导和门控。门控是离子通道在应答一个合适的刺激时打开和关闭的能力。在本节，我们将会讨论通道门控的总的原则，并描述不同 K^+ 通道的门控机制（通过 K^+ 通道的离子传导的细节见 2.5K^+ 通道催化选择性和快速的离子渗透）。

因为无控制的离子流消耗能量并且危害细胞的功能，离子通道的打开是受严格控制的。考虑到细胞体积，细胞内外的 K^+ 浓度和通过 K^+ 通道的离子转运速率，估计仅打开 10 个通道分子就可能在 1s 内抽干细胞中的 K^+。实际上，K^+ 通道在毫秒内打开和关闭，阻止离子泄漏，还可以有效地保持负的静息膜电位。要实现开和关的门控机制，以应答特定刺激，K^+ 通道经历了构象变化。

K^+ 通道的不同亚类是受不同的细胞外和细胞内信号门控的。对某些 K^+ 通道，靠把通道活性与细胞的代谢水平联系起来的内在感应机制来打开通道门。在第二类机制中，配体结合通道的细胞内区域引起构象变化来打开通道门。Ca^{2+}、ATP、三聚体 G 蛋白和内源多胺都是这种类型的配体。最后，在电压门控 K^+ 通道中，膜电位的改变导致跨膜区段的构象变化打开通道门。电压门控的一个例子是，电压依赖的 K^+ 通道的电压-敏感（voltade-sensing）机制，允许在负电压下维持静息膜电位，以及在电兴奋细胞如神经元和肌肉细胞中动作电位终止（动作电位的细节见 2.12 动作电位是依赖几种离子通道的电信号）。一些通道是同时被电压改变和配体结合控制的。这里，我们将描述由 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道和电压门控 K^+ 通道的模型。

K^+ 通道怎样实现门控？一个重要的组分是内部的或形成孔道的 α 螺旋、2TM/P 通道的 M2 或 6TM/P 通道的 S6。四个亚基中，每个亚基的 M2 或 M6 螺旋都沿着通道孔排列（图 2.8）。每一个内部螺旋都有一个关键的甘氨酸残基，具有柔曲性（flexibility），形成“门铰链”（gating hinge），这个甘氨酸残基在大部分 K^+ 通道中是保守的，允许螺旋从通道孔弯出去，如图 2.12 所示。这样，在直的构型中，四个内部螺旋形成一个闭合的孔道，靠近通道的细胞内面。在弯曲的构型中，内部螺旋向外弯曲，产生一个约 12Å 直径的开口。

图 2.13 中的一个古细菌的 Ca^{2+} 激活 K^+ 通道，有典型的 K^+ 通道四聚体孔结构。另

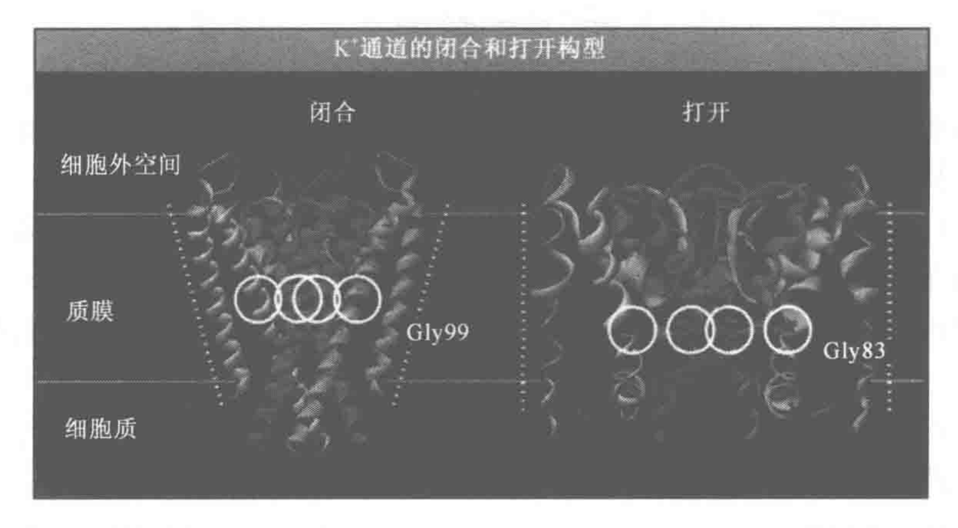


图 2.12　在提出的关闭和打开构型中，KcsA 和 MthK K^+ 通道各自的晶体结构里形成门控铰链的甘氨酸残基是围成圈的。图片来自于 Protein Data Bank file 1K4C 和 1LNQ。对于 MthK 通道，没有显示细胞质区域。标出了膜的推测位置。

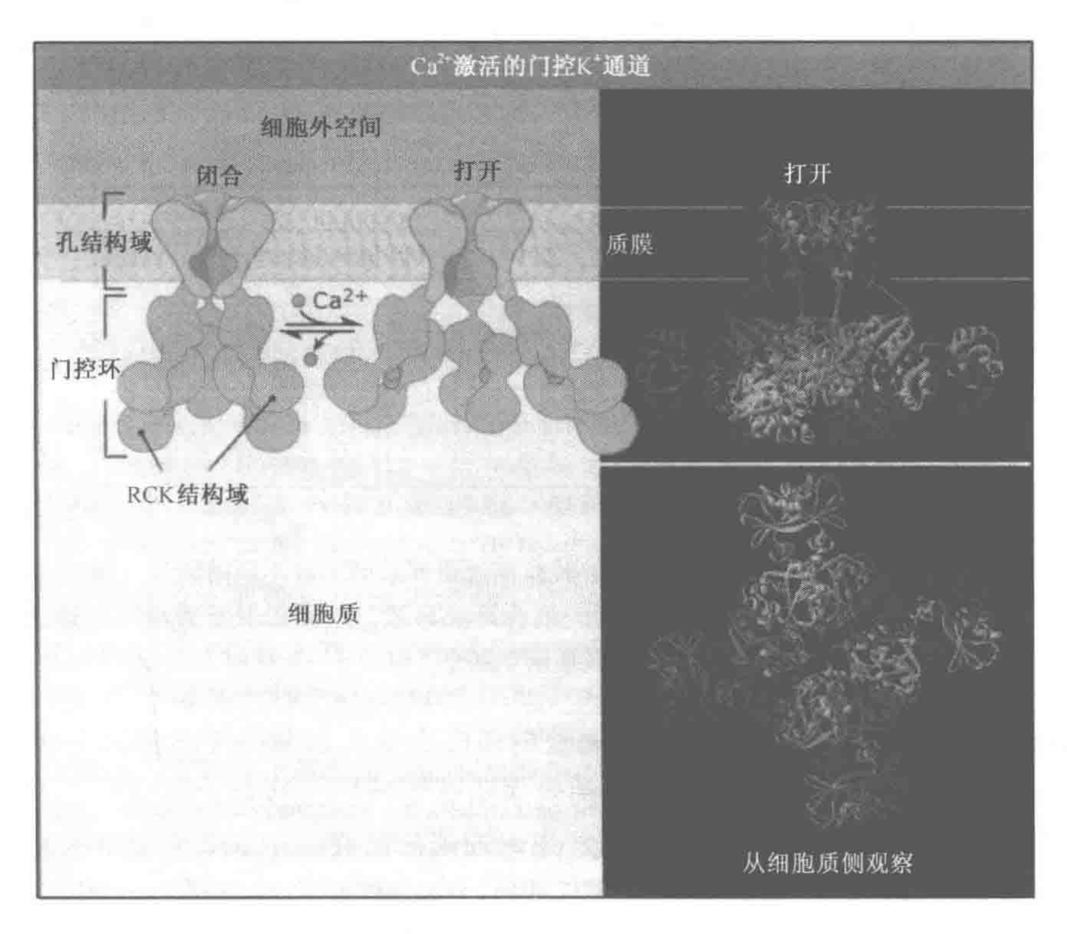


图 2.13　示意图显示的是四个 K^+ 通道亚基中的三个。在 Ca^{2+} 结合到门控环（gating ring）的 RCK 域之后，它们的环结构的直径增加，对孔道区域施加力，打开通道门。MthK 的晶体结构的图片来自于 Protein Data Bank file 1. NQ。图中标示的是膜的推测位置。

外，每一个亚基在其羧基端都有一个大的细胞内区域叫做 K^+ 传导调节（RCK）域，它结合两个 Ca^{2+}。通常认为这四个 RCK 域与四个可溶的细胞质 RCK 域相联系。从当这个通道与 Ca^{2+} 结合，呈打开构象时的晶体结构，以及一个不同的 K^+ 通道无配体的

RCK 域结构，提出了一个 Ca^{2+} 如何门控通道的模型。在这个模型中，Ca^{2+} 结合所释放的自由能被用来向外移动 RCK 域，这可以引起内部螺旋分开和细胞内侧的孔道扩宽。

电压依赖的 K^+ 通道是电压依赖的阳离子通道家族的成员，这个家族包括 Na^+ 通道和 Ca^{2+} 通道。这些通道是高度敏感的，在应答膜电压细小变化时打开。一个通道怎样"感觉"膜电压并把它转化成从闭合到开放构象的运动？所有的电压依赖阳离子通道都有含六个跨膜区段的亚基（图 2.7）。每一个亚基的头四个跨膜区段（S1～S4）形成一个电压敏感的模块，来控制孔道的打开和关闭。每个 S4 区段都有几个带正电荷的精氨酸残基（4～7，取决于通道类型），被称为门控电荷，它感觉膜电场的变化。每个通道大量的门控电荷使应答膜电压的微小变化时，离子传导陡然增加，如图 2.14 所显示的电压门 K^+ 通道那样。

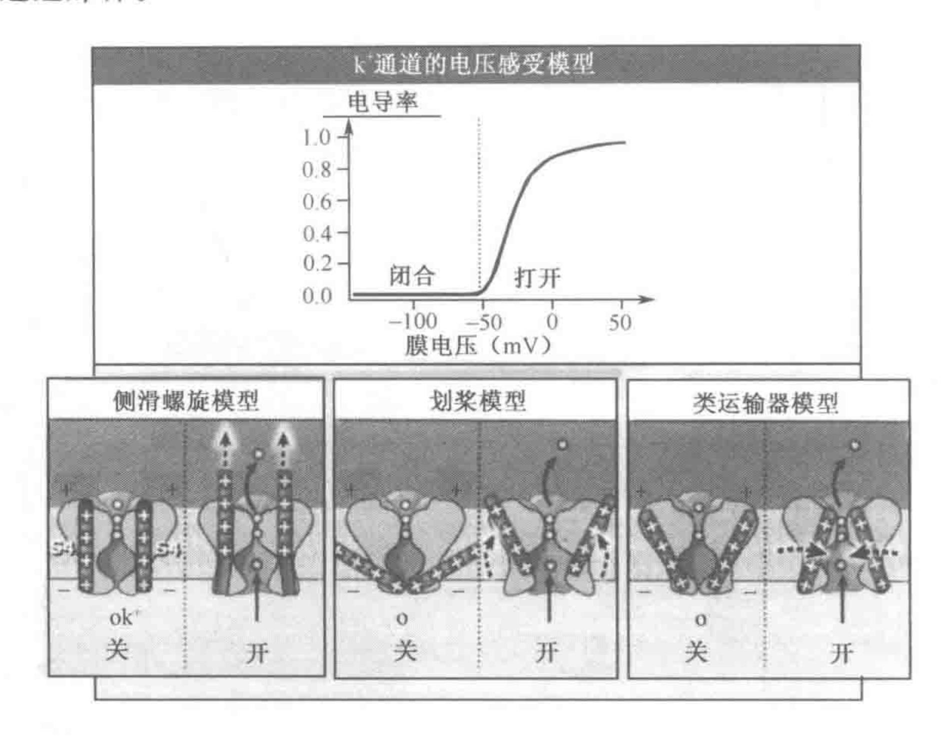


图 2.14　K^+ 通道感受的电压怎样被转换成通道开放的三种不同的模型。S4 跨膜螺旋是电压敏感区域（S1～S4）的正电荷跨膜区段。示意图展示的是四聚体通道的剖面图，每个通道的四个 S4 只展示了两个。

已经显示了在 S4 区段检测到的膜电位的正向变化引起电压传感模块（voltage sensor module）的运动，它施加一种力推动内部孔道螺旋相互分开。但是，还不是很明白电压传感器（voltage-sensor）的运动怎样引起通道的开放。有三个模型来解释应答膜电场的电荷时，电压传感器如何运动（图 2.14）。一个模型是横跨膜宽的带正电荷的 S4 区段的运动引起通道开放。第二个模型的提出是基于电压依赖的 K^+ 通道的晶体结构。在这个模型中，孔区域被四个带有可揉曲铰链的电压传感器"桨"（paddle）包围，使桨能够跨膜移动。每一个桨包括一个来自 S3 和 S4 区段的螺旋-转角-螺旋。第三个模型提出，与跨膜的位移相反，电压传感器的 S4 区段在枢轴上转动（pivot）来打开和关闭通道。这个运动使人联想起转运蛋白的构象改变（见 2.15 同向转运体和反向转运体介导耦联转运，通道调控的另一个普遍机制的细节见 2.25 补充：大部分 K^+ 通道都经历整流）。

在哺乳动物 Kv1.2 K^+ 通道中，在一个小的毫伏范围内，电压依赖门控在非传导和传导状态的转换是基于膜内侧独立域的运动。这些电压传感器（桨）通过类似于配体门离子通道的配体结合区的连接螺旋，在孔道上做机械工作。

不同 K^+ 通道的基因突变帮助我们把 K^+ 通道的异构体与它们特定的生理功能以及独特的疾病联系起来。对此做一些简要的介绍。阵发性共济失调Ⅰ型（episodic ataxia type-1）是 K^+ 通道变异影响神经系统的一个例子。这种遗传性失调的特征是运动神经过度兴奋引起的短暂的、张力诱导的失去协调性发作。这种形式的失调与 *KCNA1* 基因中功能丧失性突变相关，*KCNA1* 基因编码 Kv 通道。长 QT 综合征是一种心脏病的电形式，由 *KCNA3* 基因突变引起，它编码另一种 Kv 通道。这些突变导致心脏复极化的缺陷，会引起常发性心律不齐和猝死（见 2.12 动作电位是依赖于几种离子通道的电信号）。

2.7 电压依赖的 Na^+ 通道被膜去极化激活并转换电信号

关键概念

- Na^+ 通道的功能需要 Na^+/K^+-ATPase 维持朝向内（由外向内递减）的 Na^+ 梯度。
- 细胞膜的电信号激活电压依赖的 Na^+ 通道。
- 电压依赖的 Na^+ 通道的孔道由一个亚基组成，但其整体结构与 6TM/1PK$^+$ 通道类似。
- 阻挡孔道的特殊的疏水残基使电压依赖的 Na^+ 通道失活。

细胞维持一个朝向内（由外向内递减）的膜 Na^+ 梯度（图 2.2），它是大量 Na^+ 依赖的膜转运机制的先决条件。质膜中的 Na^+/K^+-ATPase 产生电化学 Na^+ 梯度（见 2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜中的 Na^+ 和 K^+ 梯度）。这个 ATPase 也叫做 Na^+ 泵；它利用 ATP 水解的能量逆着 Na^+ 和 K^+ 各自的电化学梯度转运 Na^+ 和 K^+。每两个 K^+ 被转运进细胞就有三个 Na^+ 被转运出细胞。这样，由于净电荷被转运出细胞，所以说 Na^+ 泵是产生电的（electrogenic）。净正电荷流出细胞造成细胞内侧相对于细胞外侧更呈负电性。Na^+ 泵的这种作用使细胞维持一个负的静息膜电位。建立电化学 Na^+ 梯度所需要的能量来自于 ATP 水解，以质膜的电化学 Na^+ 和 K^+ 梯度形式储存。

电化学 Na^+ 梯度的生理重要性显而易见，因为大量 Na^+ 依赖的通道和载体蛋白的功能都依赖这种梯度。这些 Na^+ 依赖或电压依赖的次级转运系统利用朝向内的电化学 Na^+ 梯度储存的能量驱动溶解物逆着浓度梯度积聚，或者产生动作电位形式的电信号，图 2.15 显示了其中的一些例子。两种主要的 Na^+ 依赖膜蛋白包括电压依赖的 Na^+ 通道，我们将会在本节讨论它，和上皮 Na^+ 通道（见 2.8 上皮 Na^+ 通道调节 Na^+ 的稳态）。第三种类型是 Na^+/底物转运蛋白（见 2.16 跨膜的 Na^+ 梯度对于许多转运蛋白的功能是必需的）。

可兴奋细胞，像神经元、肌肉细胞和内分泌细胞，产生或应答电信号。这些细胞被它们静息的膜电位快速而短暂的变化激活，例如在动作电位引发和传播过程中发生细胞激活（动作电位的细节见 2.12 动作电位是依赖几种离子通道的电信号）。在激活过程中，这些细胞利用 Na^+/K^+-ATPase 建立的跨膜 Na^+ 梯度把细胞膜上的电信号转换为细胞内的功能活动。电压门 Na^+ 通道在这个过程中发挥了很重要的作用，因为它们被

	Na^+跨质膜运输		
	转运蛋白	转运化学计量法	生理功能
Na^+流出	Na^+/K^+ ATP酶	3个Na^+出：2个K^+入	维持Na^+和K^+跨膜梯度
	Na^+/Ca^{2+}交换器（反向模式）	3个Na^+出：1个Ca^{2+}入	形成心脏动作电位时期Ⅰ时Ca^{2+}进入
	$Na^+/K^+/Ca^{2+}$–交换器（反向模式）	4个Na^+出：1个K^+入：1个Ca^{2+}入	适应光线
	Na^+/HCO_3^-–共转运子（肾脏）	1个Na^+出：3个HCO_3^-出	维持血液中和尿液中pH
Na^+流入	通道		
	电压依赖Na^+通道		动作电位传导时快速的Na^+流入
	上皮Na^+通道		在许多组织中具有多种作用，包括肾脏中的Na^+重吸收；表层液体离子成分的维持，胃肠管道的Na^+吸收
	交换器		
	Na^+/Ca^{2+} 前行模式	3个Na^+入：1个Ca^{2+}出	清除胞质Ca^{2+}
	$Na^+/K^+/Ca^{2+}$ 前行模式	4个Na^+入：1个K^+出：1个Ca^{2+}出	适应光线
	Na^+/H^+	1个Na^+入：1个H^+出	调节胞内pH和细胞体积
	Na^+/Mg^{2+}	2个Na^+入：1个Mg^{2+}出	维持胞内Mg^{2+}浓度
	共转运子		
	Na^+/Cl^-	1个Na^+入：1个Cl^-入	肾脏中NaCl的吸收
	Na^+/HCO_3^- 胰腺	1个Na^+入：2个HCO_3^-入	胰腺消化液pH的控制
	$Na^+/K^+/Cl^-$	1个Na^+入：1个K^+入：2个Cl^-入	肾脏中NaCl的重吸收
	Na^+/葡萄糖	2个Na^+入：1个葡萄糖入	葡萄糖肠道吸收和肾脏重吸收
	Na^+/碘化物	2个Na^+入：1个碘化物入	甲状腺和其他组织的碘化物吸收
	Na^+/脯氨酸	1个Na^+入：1个脯氨酸入	细菌对脯氨酸的吸收；肾脏中重吸收氨基酸类似的转运子

图 2.15　Na^+/K^+-ATPase通过把Na^+泵出细胞维持跨膜的Na^+梯度。Na^+通道介导顺着浓度梯度进入细胞的离子转运。一些转运体利用Na^+顺着梯度释放的能量，使其他溶解物逆着它们的浓度梯度运输。

去极化激活，去极化时膜电位迅速变得更正。当膜电位达到一个关键的域值（threshold）时，Na^+通道打开，选择性地传导Na^+离子顺着它们的电化学梯度进入细胞。Na^+通道在几毫秒内自动失活（关闭），Na^+内流停止。在生理条件下，相对少量的

Na^+快速内流改变了电场，使质膜由负电位变成正电位（指的是去极化），但是并不影响细胞内整体的Na^+浓度。

Na^+通道是膜内在蛋白（integral membrane protein），顺着电化学梯度转运Na^+进入细胞。它们催化高速率的离子流，可以达到每个通道每秒10^8个Na^+。电压门Na^+通道有一个孔-形成α亚基（pore-forming α subunit），如图2.16所示，和辅助亚基β1、β2。α亚基包含四个彼此相似的重复的结构域Ⅰ～Ⅳ。每一个重复结构域预计都包括六个α螺旋跨膜区段（segment）（1～6），有一个孔-环（P-loop）连接着区段5和6。电压传感器定位在区段4内，它含有带正电荷的氨基酸。在原子水平上，电压依赖Na^+通道的结构尚待确定。但是，已提出有一个四折对称结构围绕着离子传导通路，有四个结构域（domain）沿着离子传导通路排列，每个结构域由区段5和6以及P-环组成。这个结构与电压依赖K^+通道类似，除了K^+通道有四个分开的同一亚基（见2.5 K^+通道催化选择性和快速的离子渗透和2.6 不同的K^+通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制）。

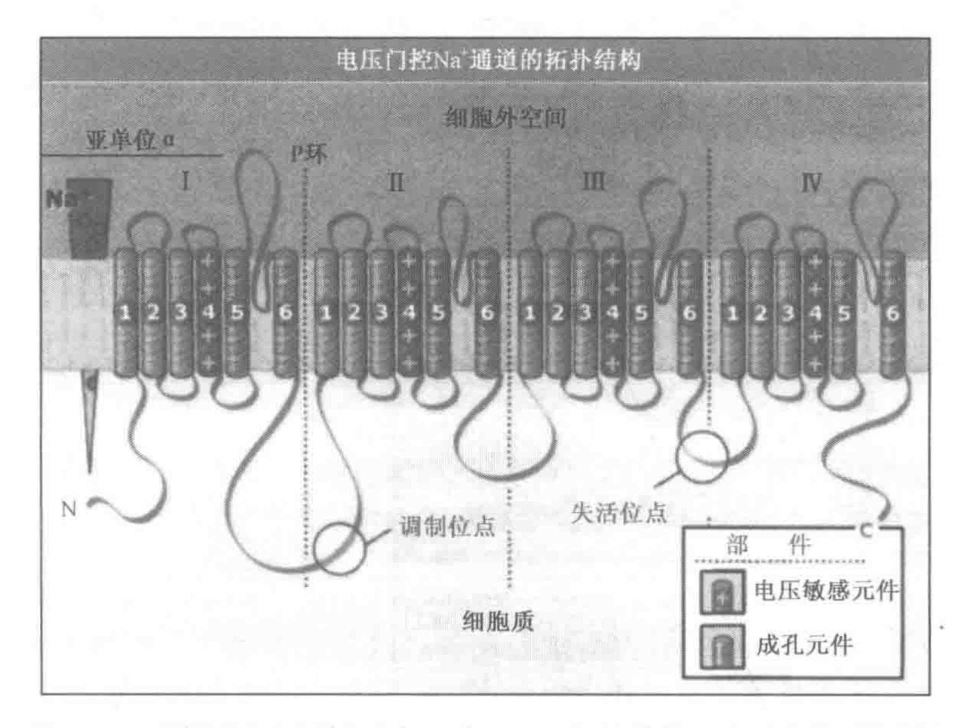


图2.16 已提出的电压门Na^+通道α亚基拓扑结构。这四个孔-形成区段（pore-forming segment）含有跨膜螺旋5和6和连接它们的P-环，预计用来形成选择性过滤器和通道门，这与K^+通道的结构类似。左边三角图形指明了跨膜的Na^+梯度。

突变实验分析了离子通道上有效氨基酸被替换时对功能的影响，说明P-环是对Na^+通道选择性过滤器有贡献的。P-环包括标识序列Trp-Asp-Gly-Leu。这个序列的突变影响通道对单价阳离子的选择性。P-环还可以结合河豚鱼的河豚毒素（tetrodotoxin）。河豚毒素的结合使参与神经细胞中动作电位起始和传播的电压门-Na^+通道失活，引发偏瘫。

据认为，在膜去极化过程中，电压传感器的构象改变和运动构成快速激活（打开）电压门-Na^+通道的基础，这一点与已提出的电压门-K^+通道机制类似（图2.14）。β亚

基改变门控过程中的动力学和电压依赖性，这也许对 Na^+ 通道的转运功能和定位在质膜上是重要的。

在电压依赖的激活之后，电压依赖的 Na^+ 通道失活（关闭）。据认为，失活发生的方式是，最初的一个快速失活步骤之后，跟随着的是第二步慢失活步骤。Na^+ 通道 α 亚基Ⅲ和Ⅳ结构域之间的细胞质环是由位点专一诱变确定的，它是快速通道失活的一个重要组分。有人提出，这个细胞质环通过一个铰链-盖（hinged-lid）机制阻塞离子孔并和一个作为疏水“闩”（latch）的序列 Ile-Phe-Met（IFM）一起发挥作用，如图 2.17 所示。甘氨酸和脯氨酸残基排列在 IFM 基序（motif）的两侧，为这个“铰链”提供揉曲性（flexibility）来使“盖”关闭。相对比的是，据认为，慢速失活门控是由 P-环决定的，它还参与外孔（outer pore）的构象改变。靠近电压传感器区段 4 的中点区域也在慢速失活过程中发挥作用。

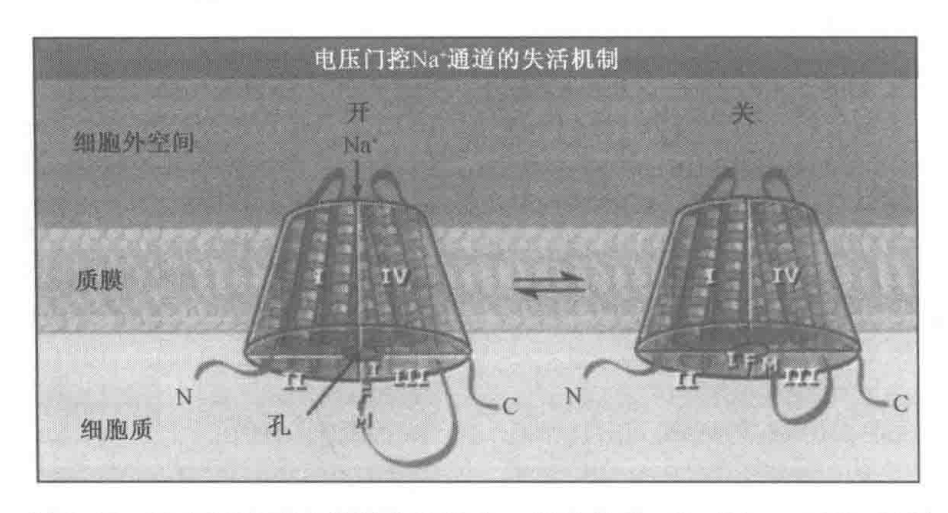


图 2.17　Na^+ 通道可能利用孔的胞内一侧的铰链-盖（hinged-lid）机制快速失活。Na^+ 通道中连接结构域Ⅲ和Ⅳ的细胞内环含有疏水失活序列基序 IFM（Ile-Phe-Met），阻塞被关闭的通道孔。

Na^+ 通道是麻醉类药物重要的靶点。突变研究表明，局部麻醉剂以很高的亲和力和结构域Ⅳ以及跨膜区段 6 结合，它们排列在 Na^+ 通道孔两侧。一些被用来治疗心律失常的药物也可以通过电压门-Na^+ 通道抑制离子流。这些被称为Ⅰ类抗心律失常的药物，在化学上与作用于神经元的叔胺局部麻醉剂（tertiary amine local anesthetic）相关。异常的膜去极化的典型特征是心律失常。Ⅰ类抗心律失常的药物被认为选择性地抑制处于失活状态的电压门-Na^+ 通道。Ⅰ类抗心律失常的药物和相关的局部麻醉剂显然是结合在 Na^+ 通道的胞内侧，并因此抑制由快速心律失常引发的膜去极化。

2.8　上皮 Na^+ 通道调节 Na^+ 的内稳态

关键概念

- 上皮 Na^+ 通道/离子通道 degenerin 家族变化多样。
- 上皮 Na^+ 通道和 Na^+/K^+-ATPase 联合引导 Na^+ 通过上皮细胞层转运。
- ENaC 选择性过滤器与 K^+ 通道选择性过滤器相似。

上皮 Na^+ 通道（ENaC）是转运 Na^+ 进入细胞的主要通道。与电压依赖通道以电功能活动为主相反，上皮 Na^+ 通道介导大量的 Na^+ 离子流和影响水的跨细胞层转运。相对于很多其他 Na^+ 转运蛋白而言，ENaC 的功能依赖于由 Na^+/K^+-ATPase 建立的 Na^+ 梯度（见 2.19Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度；2.7 膜去极化激活电压依赖的 Na^+ 通道并转换电信号；2.16 跨膜的 Na^+ 梯度对于很多转运体的功能是必需的）。ENaC 的电压依赖性不强，并不表现快速失活，而是有更多的时间受激素的复杂调节。ENaC 最初是在上皮细胞中被发现的，但是它们还在神经元和其他细胞类型中表达。ENaC 与线虫的 degenerin 蛋白序列相关，degenerin 蛋白参与接触敏感性反应。

ENaC 支持一系列功能，如血压调节、生殖、消化和协调。例如，在肾脏和消化道，EnaC 分别在血浆 Na^+ 和 K^+ 浓度，以及尿液和大便成分的维持中发挥重要作用。在肺和唾液腺中，ENaC 依赖的 Na^+ 转运帮助维持呼吸道表面液体层和消化食物的分泌液的离子组分。在本节，我们将描述 ENaC 在 Na^+ 的吸收和跨肾脏上皮细胞转运中的作用。

肾脏的主要功能是滤掉血浆中的代谢废物，如使尿素进入尿液。这样，肾脏通过调节体液的量和溶质的浓度来维持体内稳态（homeostasis），这反过来影响血压。作为复杂的过滤、重吸收和分泌过程的一部份，离子、糖、氨基酸和一些小蛋白质进入肾小管，肾小管中容纳有血浆超滤液。极性的上皮细胞沿着肾小管和导管排列。顶膜（apical membrane）面向滤液腔（lumenal）侧，基底外侧膜（basolateral membrane）面向血管中腔（lumen），如图 2.18 所示。这些特化的上皮细胞重吸收血浆滤液的许多成分，如盐和水，并把它们送回血浆，从而保持这些成分的正确浓度以及血液的体积。

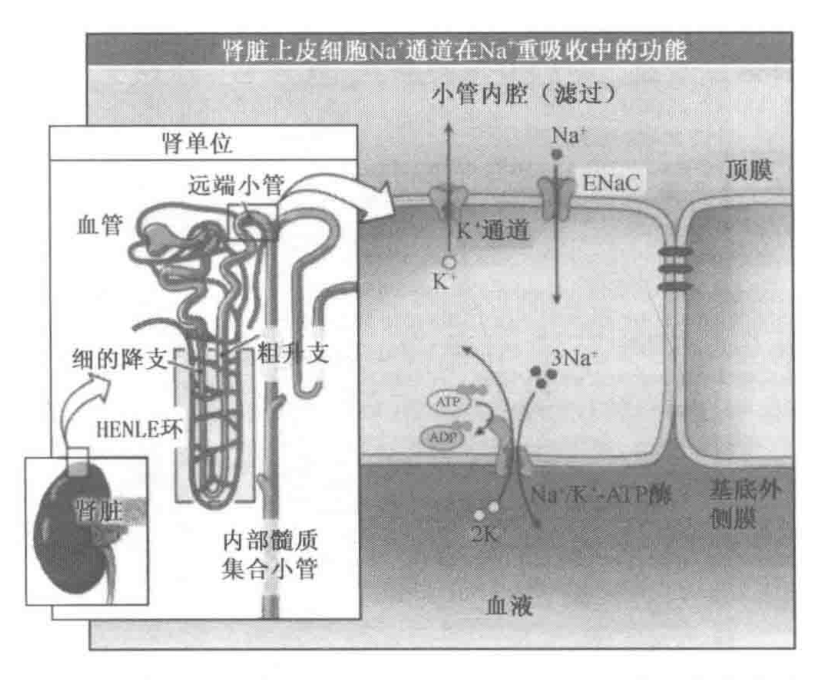


图 2.18　上皮 Na^+ 通道（ENaC）在沿着肾脏集合小管的细胞顶膜中表达，介导 Na^+ 从肾脏血浆滤液中的重吸收。

ENaC 位于肾脏的远端小管（distal tubule）和集合小管（collecting duct）中的特化上皮细胞的顶膜。在 Na^+ 从血浆滤液（尿液的前体）进入细胞的最初的地方（图 2.18）。Na^+ 顺着它们的电化学梯度（细胞外的 Na^+ 比细胞内多）经 ENaC 移动。Na^+ 通过顶膜的 ENaC 通道转运与通过跨基底外侧膜的转运耦联，结果 Na^+ 被转运回血液

的毛细血管。通过把 Na^+ 转运出细胞，Na^+/K^+-ATPase 建立起大的 Na^+ 电化学梯度，该梯度是 ENaC 行使功能所需要的。ENaC 和 Na^+/K^+-ATPase 联合作用的结果是，Na^+ 从小管中腔的血浆滤液跨过上皮细胞，最终被转运回血浆。Na^+/K^+-ATPase 是产电的（electrogenic）：每从细胞转出三个 Na^+ 离子就转进两个 K^+ 离子。另外，通过 ENaC 的 Na^+ 转运也是产电的，也就是说，顶膜的腔侧与细胞质一侧相比，变成带负电荷。这个产电的转运创造了一个相对负的腔内环境，有利于 K^+ 通过顶膜的 K^+ 通道分泌而进入滤液。这样，跨上皮层的 Na^+ 转运对于维持上皮细胞顶部和基底外侧液体的成分和体积都有十分重要的作用。肾脏远端小管和集合小管中 ENaC 的功能是重吸收大约 7% 滤过的 Na^+ 和 Cl^-，并分泌可变数量的 K^+（Na^+/K^+-ATPase 的更多细节见 2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度）。

Na^+ 通过 ENaC 从肾脏滤液中的重吸收是受醛固酮（aldosterone）和血管加压素（vasopressin）调节的。这些激素分别从肾上腺和脑垂体中释放，依靠脱水或脱盐，与肾细胞上的受体结合。这导致质膜上 ENaC 的表达和通过 ENaC 从滤液中重吸收 Na^+ 并将其转运进血浆。激素调节允许根据急性代谢需要维持 Na^+ 和液体的平衡（肾脏功能中其他通道的作用的讨论见 2.10 Cl^- 通道发挥不同的功能 和 2.11 水通道选择性转运水）。

ENaC 包括三个同源亚基——α、β、γ，它们形成一个多聚体通道复合物。还没有得到 ENaC 的高清晰结构。但是，从体外重构研究和序列分析推测，每一个 ENaC 复合物包括四个亚基（两个 α 亚基，一个 β 亚基，一个 γ 亚基），每一个亚基都贡献于中心通道孔的形成，如图 2.19 所示。预示的每一个亚基的拓扑结构都有两个跨膜区段，具有细胞内氨基端（N 端）和羧基端（C 端）胞质区域（intracellular N- and C-terminal

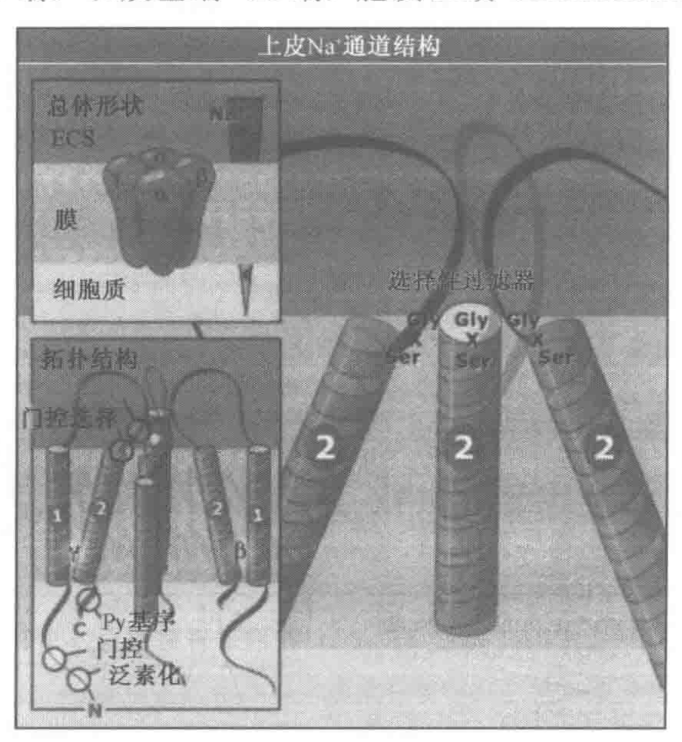


图 2.19 上皮 Na^+ 通道（ENaC）包括两个 α 亚基，一个 β 亚基，一个 γ 亚基。据预告，每一个亚基都有两个跨膜区段，一个细胞外环和细胞内氨基和羧基端。每一个亚基都为选择性过滤器贡献 Gly-X-Ser 残基。ENaC 的泛素化（ubiquitination）是调节其内化（internalization）和 Na^+ 转运活性的机制之一。其他机制包括醛固酮诱导的细胞内残基的磷酸化。

cytoplasmic domain)。四聚体通道的每一个亚基都贡献于穿过第二个跨膜区段的孔。

ENaC 选择性过滤器允许通道选择性转运 Na^+。选择性过滤器含有临近第二个跨膜区段的标识基序 Gly-X-Ser（X 可以是几个氨基酸残基中的一个），在孔道的最窄处（图 2.19）。由电生理测量可知，三个残基中的任何一个突变都会导致离子传导性的强烈改变。据认为，Gly-X-Ser 的主链羰基氧原子沿着选择性过滤器排列，并稳定具有特定直径的部分脱水离子。这种排列与某种 K^+ 通道的选择性过滤器相似，然而由序列同源性可知，这些 K^+ 通道与 ENaC 无关（见图 2.9 和 2.5 K^+ 通道催化选择性和快速的离子扩散）。

利尿剂氨氯吡脒（amiloride）阻断通过肾脏远端小管和集合小管的中腔膜上的 ENaC 重吸收 Na^+（图 2.18）（因而，在电生理测量中，ENaC 的功能以氨氯吡脒敏感的 Na^+ 离子流为其特征）。氨氯吡脒与 Na^+ 竞争结合到 ENaC 的细胞外侧，靠近选择性过滤器。在肾脏的远侧肾单位，氨氯吡脒对 Na^+ 重吸收的影响是临床上应用利尿剂治疗高血压的基础。因为氨氯吡脒治疗将导致从滤液中重吸收 Na^+ 的减少，尿液中排出的 Na^+（和水）增加。重吸收进上皮细胞的 Na^+ 减少将使血液中的 Na^+ 浓度降低，这会降低血压或使血压正常化。

ENaC 基因突变能导致严重的血压调节异常。在一种被称为 Liddle's 综合征的罕见的遗传性高血压病中，ENaC 突变引起通道的过度激活和肾脏远端肾单位不正常的高水平 Na^+ 重吸收，导致血浆体积增加，动脉高血压以及血浆中 K^+ 水平降低。引起 Liddle's 综合征的突变定位在通道的 β 或 γ 亚基基因上。相对照的是，Ⅰ型假性醛固酮减少症（pseudohypoaldosteronism type Ⅰ）中，ENaC 功能降低性突变与血压过低（降血压）、血浆中 Na^+ 水平降低，以及 K^+ 升高联系在一起。这些遗传性疾病的特征对我们深刻理解醛固酮对上皮细胞 Na^+ 通道的复杂调节，以及该药物对血压调节和血浆稳态的贡献有重要意义。

2.9 膜 Ca^{2+} 通道激活细胞内功能

关键概念

- 细胞表面 Ca^{2+} 通道把膜信号转换成细胞内信号。
- 电压依赖的 Ca^{2+} 通道是由 5 个不同的亚基组成的非对称蛋白质复合物。
- 电压依赖的 Ca^{2+} 通道的 α 亚基形成孔隙，并含有类似于 K^+ 通道的孔环结构。
- Ca^{2+} 通道的选择性过滤器形成了一个静电捕获器（electrostatic trap）。
- 通道阻断物使 Ca^{2+} 通道稳定在关闭状态。

钙（Ca^{2+}）是第二信使，控制很多细胞功能，包括心脏和骨骼肌的收缩、视网膜的视觉处理、T 淋巴细胞的免疫应答、神经元兴奋和情绪行为，以及胰腺 β 细胞分泌胰岛素。细胞功能的激活是靠胞质溶胶中钙浓度的变化介导的，静息细胞中钙离子的浓度比细胞外钙离子的浓度低大约 10 000 倍（图 2.2）。内质网（ER）和肌质网（SR）储存 Ca^{2+}，并与细胞外环境有相同的浓度。

胞内钙水平的改变是受一系列可溶的 Ca^{2+} 结合蛋白和跨膜 Ca^{2+} 转运蛋白的协同作用调节的。例如：质膜、内质网和肌质网上不同类型的 Ca^{2+} 通道催化 Ca^{2+} 顺着其电化

学梯度进入胞质的选择性转运。不同的 Ca^{2+} 通道是由不同的机制门控的，涉及细胞外配体、膜电压的变化或 Ca^{2+} 本身，就像图 2.20 所示的那样。当质膜上的 Ca^{2+} 通道关闭和 Ca^{2+} 经专门的转运蛋白被排出细胞，Ca^{2+} 介导的信号就停止（见 2.18 Ca^{2+}-ATPase 把 Ca^{2+} 泵入细胞内的储存隔室中）（Ca^{2+} 从 ER 和 SR 释放的更多细节见 2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。Ca^{2+} 依赖的失活作用和电压依赖的失活是两种主要的机制，作用是控制质膜上的 Ca^{2+} 通道关闭和防止过量的 Ca^{2+} 进入引起细胞损伤。Ca^{2+} 内流时，作为应答，钙调素（calmodulin）蛋白活化并结合到 Ca^{2+} 通道的细胞内区域，使很多类型的 Ca^{2+} 通道因负反馈失活。在本节，我们将讨论通过 Ca^{2+} 通道的离子流动的可能机制，集中关注一类电压门控 Ca^{2+} 通道，并将其与 K^+ 通道的机制相比。

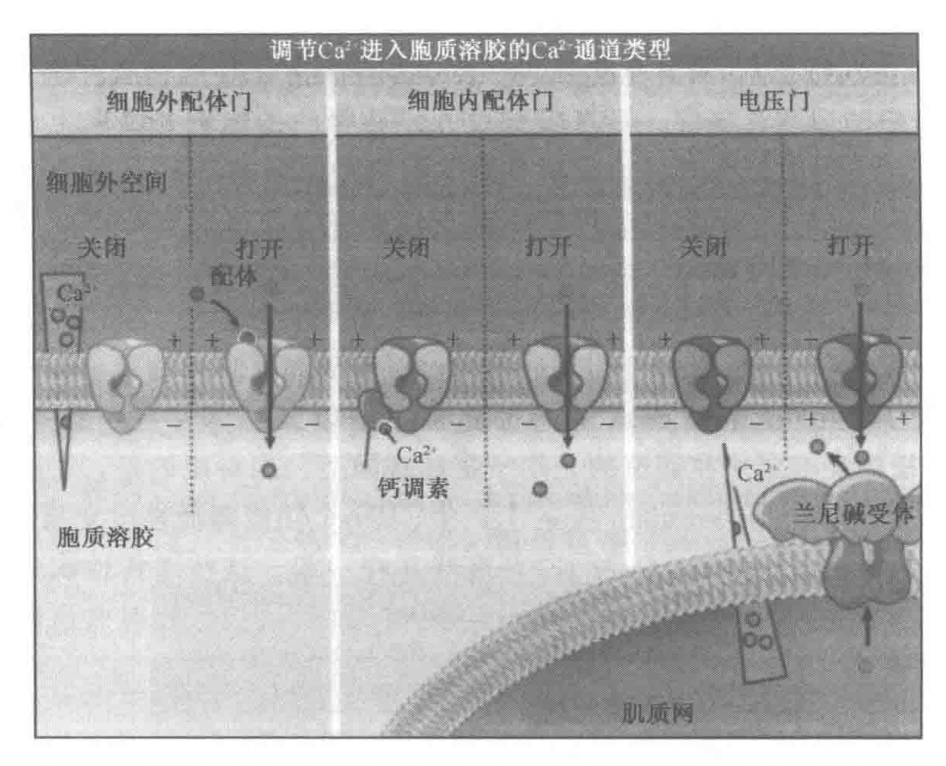


图 2.20　三种基本的通道转运把 Ca^{2+} 从细胞外转运到胞质中。另外，离子通道将 Ca^{2+} 从细胞质内的 Ca^{2+} 库（Ca^{2+} store）转运到胞质溶胶。三角图形指明了跨质膜和内质网膜保持的 Ca^{2+} 梯度。

当膜电位在去极化期间变得更正时，电压门控 Ca^{2+} 通道允许 Ca^{2+} 进入细胞（见图 2.20）。这些通道把质膜上的电信号转换为细胞内信号。Ca^{2+} 内流使细胞内的 Ca^{2+} 浓度增加，达到一定水平，从而激发了一系列过程，如肌肉收缩、激素或神经递质的释放、Ca^{2+} 依赖的信号级联激活和基因转录（肌肉收缩的细节见 2.13 兴奋-收缩耦联激活心脏和骨骼肌侧重肌肉收缩）。这些不同类型的电压门 Ca^{2+} 通道依据它们的电生理和药理学性质分类。这里我们将描述 L 型 Ca^{2+} 通道，它是第一个被克隆的，到目前为止研究得最多的一类通道。L 型 Ca^{2+} 通道分布在骨骼肌、心脏和平滑肌细胞的质膜以及神经元上，被膜的去极化激活。

L 型 Ca^{2+} 通道之所以被这样称呼，是因为它们的长时间开放性。这些通道包括位于骨骼肌、心脏和平滑肌细胞以及神经元、内分泌腺、视网膜细胞上的主要的 $Ca_v1.X$ 亚型。L 型 Ca^{2+} 通道是由 5 个亚基：α1、α2、δ、β 和 γ 组成的异寡聚蛋白复合物，在

图 2.21 中描述。Ca^{2+} 通道的调节和靶向到细胞膜需要全部亚基。对 α1 亚基序列作疏水和亲水残基分析，预示有四个孔-形成单位，每个单位都由跨膜区段 5 和 6、一个孔环（pore loop）和四个电压敏感区段组成，孔环贡献于选择性过滤器，每个电压敏感区段包含跨膜区段 1～4。这种跨膜组织类型与电压门 Na^+ 通道（见图 2.16 和图 2.7）和电压依赖的 K^+ 通道相似（见 2.6 不同的 K^+ 通道用相似的门控耦联不同的激活和失活机制）。β 亚基的作用是激活或关闭通道。它与 α 亚基相结合（engage），并通过与区域 I（domain Ⅰ）中的孔-形成跨膜区段 S6 相互作用来影响门控。



图 2.21　预测的 L 型 Ca^{2+} 通道亚基的膜拓扑结构。右下的两个视图展示了其三维表面结构，是由冷冻电镜获得的。图片来自于 Serysheva，I. I，et al. 2002. *PNAS.* 99：10370-10375. Copyright 2002 National Academy of Science。照片来自于 Baylor 医学院的 Susan L. Hamilton。

L 型电压门 Ca^{2+} 通道的三维结构已经由冷冻电镜得到，揭示了它是一个不对称的心形蛋白，并在其最宽的延展部分有一个把手形区段（handle-shaped region）。包括把手形结构的 Ca^{2+} 通道的最大一部分位于细胞外，包括 α2 亚基、δ 亚基的 N 端和 α1、γ 亚基的细胞外环。

Ca^{2+} 通道对 Ca^{2+} 具有高度选择性，高于对 Na^+ 离子的透性，还允许高速率的离子渗透。Na^+ 是细胞外含量最丰富的阳离子，数量大约是 Ca^{2+} 的 100 倍（见图 2.2）。Na^+ 与 Ca^{2+} 的直径几乎相等，都是 2.0Å。这样，一个简单的分子筛并不能把它们区分开。那 Ca^{2+} 通道是怎样能够既对 Ca^{2+} 有高度选择性，同时又允许 Ca^{2+} 高速流动的呢?

K^+ 通道的孔有选择性过滤器，作为替代的水环境来稳定渗透的离子，这些渗透的离子在通过选择性过滤器时脱水。例如：K^+ 通道的选择性过滤器有四个 P 环，形成相对稳固的结构，排列着主链的羰基氧原子，在一个直线形的渗透通路中，羰基氧原子使

K^+ 协调在特定的位置（见 2.5K^+ 通道催化选择性和快速的离子渗透）。电压门 Ca^{2+} 通道的选择性过滤器也很像是由四个 P 环构成。然而，被认为有一个更柔韧的结构，每一个 P 环贡献一个谷氨酸，这样，是碳氧原子而不是羰基氧沿着阳离子渗透通路排列，就像图 2.22 所示（这种分布很像 EF 手型 Ca^{2+} 结合位点，Ca^{2+} 位于含有氧原子的一个口袋中，许多氧原子来自碳氧基团）。这四个谷氨酸残基形成所谓的 EEEE 座位（locus），这个结构在 Ca^{2+} 通道中是很保守的。

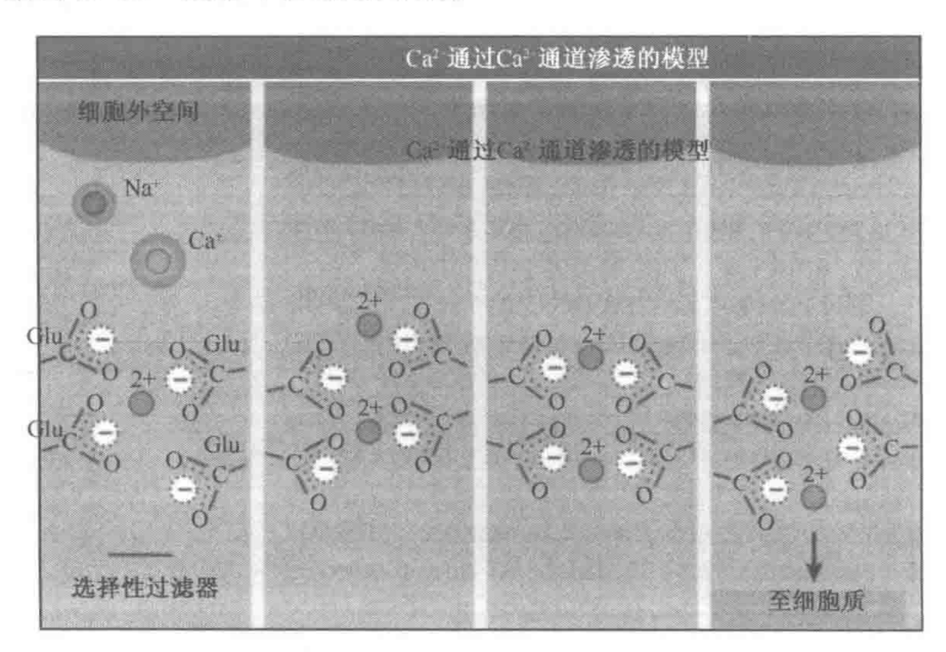


图 2.22　Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} 通道的 EEEE 座位渗透的一个假设机制。Ca^{2+} 在能量上稳定碳氧原子，并且防止 Na^+ 透过，Na^+ 并没有足够的正电荷适合在 EEEE 座位内以及有效地部分脱水。孔道中的 Ca^{2+} 的静电斥力可能有利于快速扩散。

EEEE 座位负责 Ca^{2+} 的选择性渗透，而不是对其他生理性阳离子。用其他氨基酸来替代这四个谷氨酸残基的任意一个，结果，通道对 Ca^{2+} 的选择性就会受损。谷氨酸侧链被认为是介导 Ca^{2+} 在接近细胞外的孔道入口处的高效结合，而不是对其他离子。这个看法基于体外电生理测量，测量显示在 Ca^{2+} 缺席的情况下，Na^+ 可以透过 Ca^{2+} 通道。另外，Na^+ 比 Ca^{2+} 透过通道的速度更快。Ca^{2+} 通过的速度慢说明 Ca^{2+} 比 Na^+ 以更高的亲合性结合到通道孔，可能会更有效地阻止大部分 Na^+ 进入通道，甚至是在细胞外空间 Na^+ 离子比 Ca^{2+} 离子多的情况下。

Ca^{2+} 通道对 Ca^{2+} 的亲合力大约是 10^{-6} mol/L。但是，这种亲合力给出的离子渗透的计算速率比测量到的速率 10^6/s 低 1000 倍。现在已经提出了一个使亲合力和流动速率协调一致的模型。在这个模型中，EEEE 座位接纳多个 Ca^{2+}，并且一个 Ca^{2+} 进入孔道会由于 Ca^{2+} 之间的静电斥力引起已结合的一个 Ca^{2+} 从另一侧释放（见图 2.22）。这样，静电斥力帮助克服 Ca^{2+} 结合的亲合力，这将减慢 Ca^{2+} 的渗透。这个模型与提出的 K^+ 通道模型相似，K^+ 通道模型展示了一系列单独的离子结合位点（见 2.5K^+ 通道催化选择性和快速的离子渗透）。

电压依赖的 Ca^{2+} 通道是临床治疗高血压和其他疾病药物的主要靶点。常用药物包

括苯烷基胺（phenylalkylamines）、苯并硫氮杂䓬（benzothiazepines）和二氢吡啶（dihydropyridines），它们通常作为 Ca^{2+} 的拮抗剂。Ca^{2+} 拮抗剂最先被应用到医疗实践中，例如用舒血管剂（vasodilators）治疗高血压。Ca^{2+} 拮抗剂降低平滑肌中的 Ca^{2+} 水平，例如在血管中，使血管强直舒张和降低血压。突变和结合方面的研究确定了在建议的选择性过滤器的细胞质侧，结构域Ⅲ的区段 S5 和 S6 以及结构域Ⅳ的区段 S6 上的药物结合位点（见图 2.21）。苯烷基胺抑制剂通过直接与选择性过滤器的 P 环上的谷氨酸残基相互作用，从细胞质侧阻断 Ca^{2+} 通道，而二氢吡啶和苯并硫氮杂䓬从细胞外侧进入通道孔。

2.10 Cl^- 通道有多种多样的生物学功能

关键概念

- Cl^- 通道是阴离子通道，发挥很多生理功能。
- Cl^- 通道用反平行的亚基结构来建立选择性。
- Cl^- 通道中选择性的传导和门控在结构上是耦联的。
- K^+ 通道和 Cl^- 通道有不同的门控和选择性机制。

氯离子（Cl^-）通道是阴离子通道家族的一个大的成员。和其他的离子通道一样，Cl^- 通道蛋白在生物膜上形成孔结构。在体外实验中，Cl^- 通道允许带负电的 Cl^- 顺着它们的电化学梯度转运。作为一个非选择性的阴离子通道，Cl^- 通道在某些情况下能更好地传导其他阴离子。但是，Cl^- 是有机体中含量最丰富的阴离子，因此在体内是这些通道转运的占优势的离子。

Cl^- 通道存在于质膜和胞内细胞器的膜上。Cl^- 通道的一些最重要的功能包括细胞体积的调节，离子内稳态和跨上皮细胞的离子转运。质膜的 Cl^- 转运对于调控肌肉和神经元的膜兴奋性也是很重要的。此外，在细胞内隔室如内体（endosome）酸化时，Cl^- 通过 Cl^- 通道转运到细胞器去中和由 H^+-ATPase 转运来的质子的正电荷（见 2.21 H^+-ATPase 转运质子出细胞质）。

Cl^- 通道可被分为三个不同的基因家族。首先，*CLC* 基因家族有一些成员定位在质膜或细胞内隔室的膜上。从细菌到人，CLC 通道都是保守的并且可以根据同源性分成几个亚类。其次，囊性纤维化（cystic fibrosis）跨膜传导调节者（transmembrane conductance regulator）是唯一的 ABC 转运载体（transporter）家族的成员，据知它是作为离子通道发挥功能的（见 2.26 补充：阴离子通道的突变引起囊性纤维化）。再次，配体门控 γ-氨基丁酸受体和甘氨酸受体是 Cl^- 通道另外的家族的成员，在中枢神经系统中发挥着特殊作用。

CLC Cl^- 通道是二聚体，每一个亚基都形成自己的离子-传导孔。还没有得到真核 CLC Cl^- 通道的 X 射线晶体结构来提供原子水平的视图。但是，细菌的 CLC 蛋白的晶体结构已经被描绘了。细菌的 CLC 蛋白作为载体蛋白转运 Cl^-，是与质子交换的方式，而不是我们原先所设想的 Cl^- 通道。但是，基于序列的同源性，细菌的转运蛋白的一些特征很像是与真核生物的 CLC Cl^- 通道类似。确实，细菌转运蛋白也是二聚体，如图 2.23（见图版）所示。每一个亚基都包含 18 个 α 螺旋，排布成一个复杂的膜内拓扑结

构。一个亚基的N端（螺旋A～I）这一半在结构上与其C端（螺旋J～R）那一半是相互联结的。这两半部分有相反（antiparallel，反平行）的膜取向，类似于不相干的水通道的结构（见图2.11）。

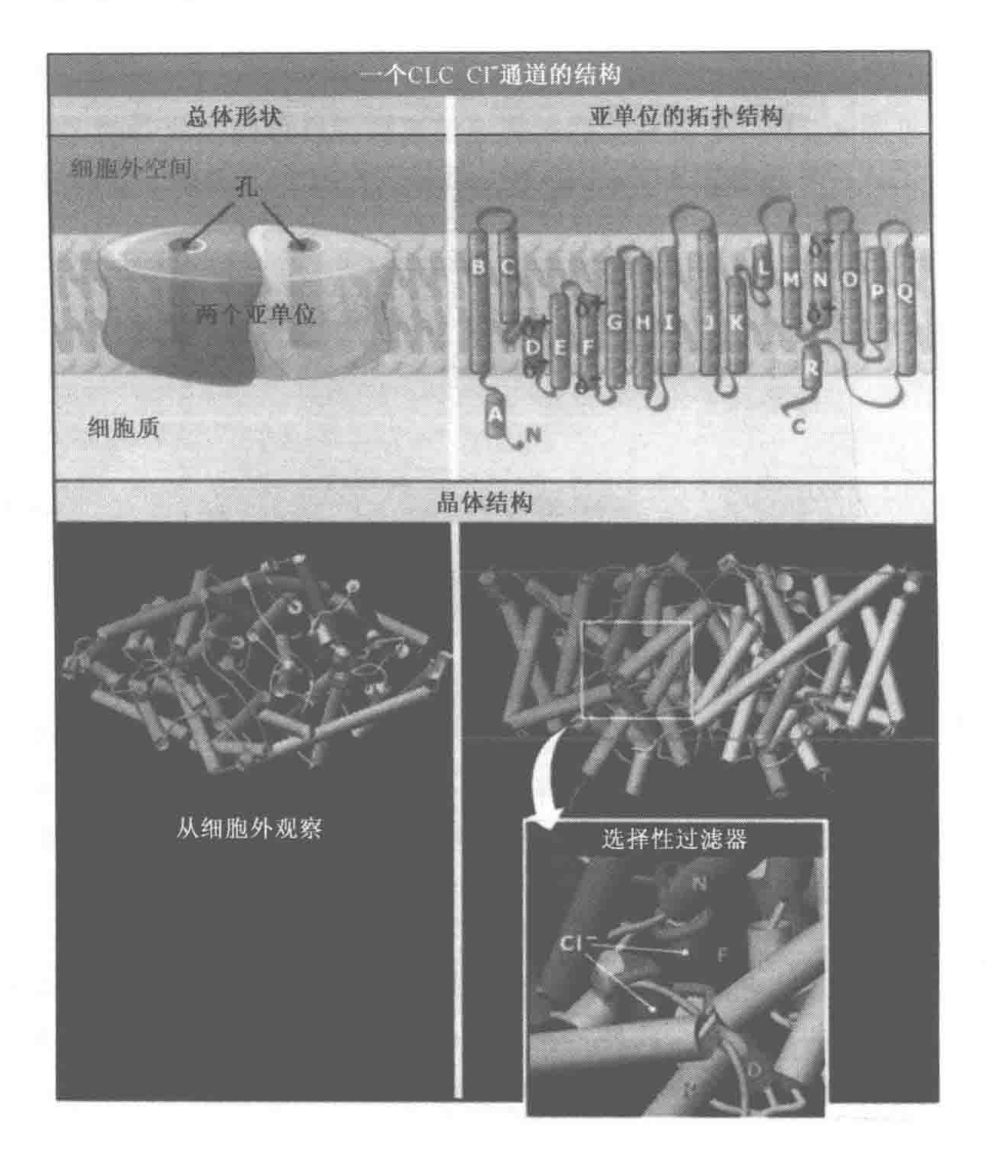


图2.23　一个细菌的CLC Cl^-转运蛋白复合物的X射线晶体结构及模式图。CLC家族的Cl^-转运蛋白形成二聚体，每一个亚基都形成一个单独的孔结构。一个蛋白亚基中贡献于选择性过滤器的部分用橘黄色标出。晶体结构图片来自于Protein Data Bank file 1KPK。展示的细胞外视图比侧面视图（side view）小。图中指示的是膜的可能位置。

所有CLC Cl^-通道的一个重要特征是离子传导性和门控是内在耦联的。这个特征从真核生物CLC选择性过滤器的结构就能看得出来。孔形成沙漏形，选择性过滤器是在蛋白中央孔结构最狭窄的部分。有两个组分有助于对阴离子的选择性大于阳离子。首先，四个α螺旋区段（D、F、N和R）把它们部分带正电的N端的阳离子插入膜的中心平面（见图2.23）。其次，沿着孔排列的特定氨基酸与Cl^-离子形成疏水键，如图2.24所示。这些组分将Cl^-离子稳定在选择性过滤器中和排斥阳离子，为Cl^-提供了一个有利的静电环境。

选择性过滤器一侧的谷氨酸侧链被认为起到一个门的作用（见图2.24）。这个门如

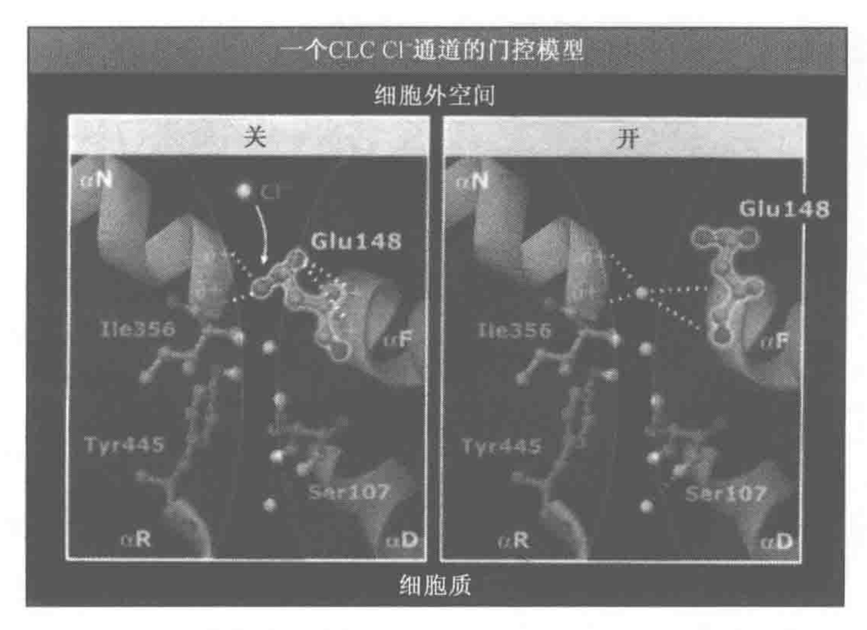


图 2.24 Cl^- 通道的选择性过滤器包括三个 Cl^- 结合位点。在关闭的构象中，谷氨酸侧链（G148）占据了 Cl^- 结合位点，这个位点最接近细胞外腔室。在通道打开的构象中，这个侧链摇摆到通路之外，允许 Cl^- 结合。参与协调其他两个 Cl^- 的残基也被显示出来。图片基于大肠杆菌 CLC 通道的晶体结构，来自于 Protein Data Bank file 1OTS。

何工作的模型是基于野生型细菌 CLC 转运蛋白的 X 射线晶体结构以及突变的转运蛋白。在这个突变的转运蛋白中，用不同的残基替换谷氨酸，当通道关闭时，这个特殊的谷氨酸侧链占据 Cl^- 结合位点，因此模仿了被 Cl^- 占据时的情形。谷氨酸侧链摇摆出渗透通路，到达细胞外腔室中，打开了通道门并被一个正在透过的 Cl^- 替代。这个谷氨酸侧链在几乎所有的 CLC 通道中都是保守的。因此，细菌的 CLC 转运蛋白与真核生物 CLC Cl^- 通道的转运蛋白很可能是相似的。

是什么引发谷氨酸门旋转成打开的位置？是通过配体、电压或细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化门控不同的 Cl^- 通道。Cl^- 通道还可以被 Cl^- 梯度激活。图 2.24 展示的模型预告，在高于一定的细胞外 Cl^- 浓度时，Cl^- 把谷氨酸门从 Cl^- 结合位点替换出来，并允许阴离子透过。这样，Cl^- 和其他谷氨酸侧链上的带负电的羧酸酯基团（carboxylate group）经受静电排斥，并彼此竞争与 α 螺旋的 N 端的部分正电荷形成离子键。这种安排允许快速的阴离子传导和由渗透的 Cl^- 直接调节门控。由于膜电压的变化可以急剧加大跨膜 Cl^- 梯度的电化学电位，这个模型还解释了电压依赖的大部分 CLC Cl^- 通道的开放。CLC Cl^- 通道没有带电荷的跨膜区域可以作为电压传感器，这种电压传感器在电压依赖的阳离子通道上存在（见 2.6 不同的 K^+ 通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制）。

Cl^- 通道和 K^+ 通道用根本上不同的机制去建立离子传导和选择性。首先，在 CLC Cl^- 通道中，选择性过滤器和门形成一个结构单位。相对而言，在 K^+ 通道中，选择性过滤器和门在结构上是分开的，分别位于通道的细胞外侧和细胞内侧（见图 2.8）。这两个结构组分的分开，允许配基结合区域或电压传感区域通过构象变化打开和关闭孔结

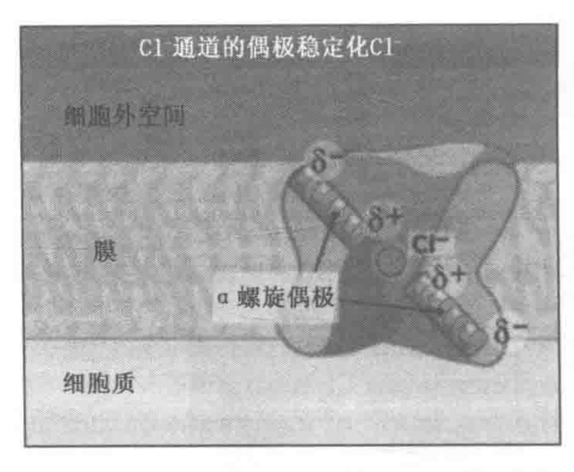


图 2.25 一个 CLC Cl^- 通道亚基的两半有一种反平行的方位，以至于特定 α 螺旋的部分带正电的偶极朝向选择性过滤器，并影响 Cl^- 从膜的相反位置结合。图只展示了一个亚基。

构，而不影响选择性过滤器；这种结构必须被保持，为的是区分半径只有很小差别的各种阳离子。其次，Cl^- 通道门似乎参与一个更小的运动（谷氨酸侧链的旋转），而不是像 K^+ 通道那样有一个较大的构象改变（见 2.6 不同的 K^+ 通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制）。再次，对 Cl^- 离子或 K^+ 离子有利的静电环境，分别来自于部分正电荷或部分负电荷。CLC Cl^- 通道用一种反平行结构使 N 端螺旋偶极的部分正电荷指向选择性过滤器，如图 2.25 所示。反之，K^+ 通道用一个平行的结构使 C 端螺旋偶极的部分负电荷朝向一个充水的凹槽，作为它们选择性过滤器的一部分，如图 2.11 所示。

Cl^- 通道在跨上皮离子转运中的作用，以 CLC-K 通道在肾中的作用为例说明，如图 2.26 所示。这些通道在 Henle's 袢粗升支（thick ascending limb of Henle's loop）的细胞基底外侧膜中的表达需要与 β 亚基的 barttin 相互作用。Henle's 袢粗升支的功能是在该解剖部位有 25%离子（NaCl 和 K^+）重吸收，而且不能透过水。尤其是，CLC-K 通道对于 NaCl 的重吸收是必需的，并且间接影响血浆中 K^+ 浓度的维持，这是很重要的，因为神经系统和心脏对于 K^+ 浓度的变化非常敏感。肾脏从血液中过滤出废物，一起的还有离子。在这个过程中，阴离子和阳离子从血液中失去，进入血浆滤液成为原尿，这些离子必须被大量地重吸收来保持血液中这些离子的正确浓度。在 Henle's 袢粗升支 的上皮小管区段，Na^+ 和 Cl^- 从滤液中被重吸收（Na^+ 重吸收的更多细节见 2.8 上皮 Na^+ 通道调节 Na^+ 的稳态）。通过顶膜上的 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体从滤液中重吸收 Cl^-。这种转运是由基底外侧膜上 Na^+/K^+-ATPase 驱动的，该酶把 Na^+ 泵出细胞建立一个跨膜的 Na^+ 梯度。细胞内的低 Na^+ 浓度提供了一个有利的电化学梯度，为 Na^+ 耦联的转运过程的运动所用。经由顶部的 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体重吸收 Cl^-，增加了细胞内 Cl^- 浓度，以至比细胞外管腔中的 Cl^- 浓度高，这使 Cl^- 顺着其离子梯度离开细胞。Cl^- 通过基底外侧膜上 CLC-K Cl^- 通道出细胞进入血液。K^+ 通过顶部的 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体和基底外侧膜的 Na^+/K^+-ATPase 进入细胞，通过顶部和基底外侧膜的 K^+ 通道出细胞。如果没有 CLC-K Cl^- 通道，通过 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体的离子流就会不足，导致 NaCl 和 K^+ 的重吸收降低。

在大多数哺乳类细胞中，K^+ 的传导控制静息状态下的膜电位，与此相反，在骨骼肌中，CLC-1 氯离子通道异构体提供大约 80%的静息膜电位。不同的 CLC Cl^- 通道与其他离子转运蛋白配合所起的重要作用，已经被基因突变引发的人类疾病和缺乏特异性 Cl^- 通道异构体表达的基因敲除小鼠揭示了。例如，CLC-1 通道的失活突变引起不同形式的肌肉收缩延长，叫做肌强直（myotonias），其异常的兴奋性导致骨骼肌僵硬，松弛功能受损。CLC-K 氯离子通道的突变，或在肾脏和耳朵中表达的 barttin 亚基都会导致常染色体隐性遗传性失调（autosomal- recessive genetis disorder），叫做 Bartter's 综合

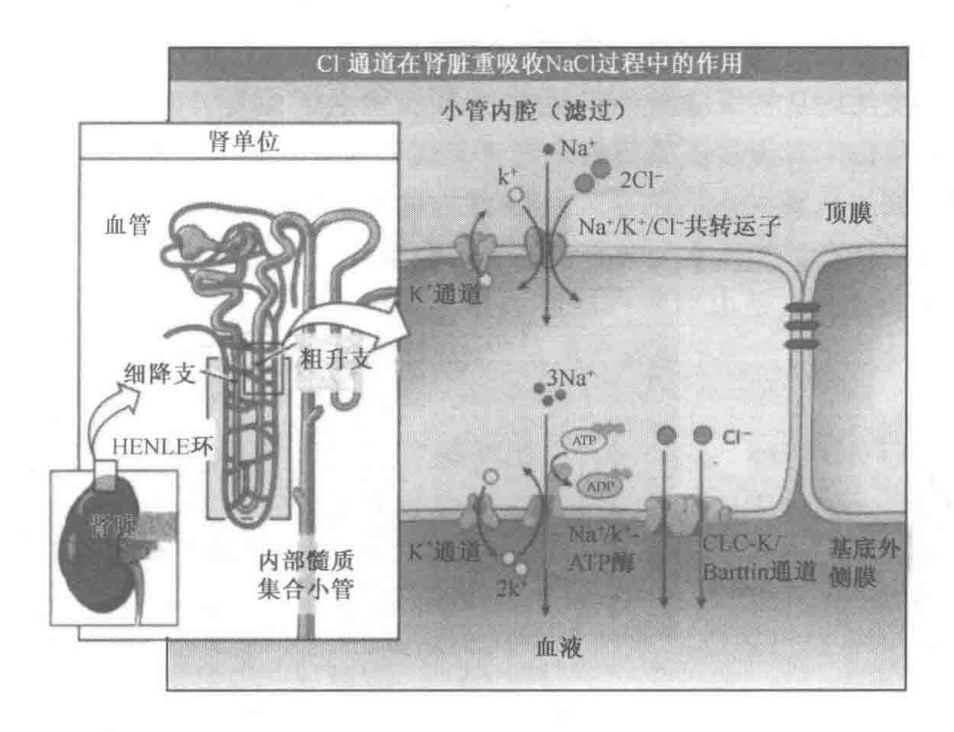


图 2.26　肾中跨上皮的 NaCl 转运。在特殊的肾单位区段（Henle's 襻粗升支）的上皮细胞，通过顶膜的 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体和细胞基底外侧膜中的 CLC 通道，从滤液（尿）中重吸收 Na^+ 和 Cl^-。

征。在这种情况下，Cl^- 离子不能从尿液中充分地重吸收，导致血浆低 K^+ 水平、代谢性碱中毒、补偿性醛固酮增多症（hjyperaldosteronism）（肌体努力抵消低血浆容量和低血压）和感音神经性耳聋（sensorineural deafness）。细胞内的 Cl^- 通道异构体 CLC-5 在胞吞作用中行使功能，在内吞体酸化中起分流作用，这个基因的突变将导致 Dent's 病，其典型特征是尿中过量钙和蛋白质丢失以及肾结石。进行骨吸收的破骨细胞的膜中包含 CLC-7 Cl^- 通道，该通道与进行酸分泌的 H^+-ATPase 协同作用，以确保酸分泌的电中性。Cl^- 通道异构体 CLC-7 的突变导致骨重吸收缺陷，并伴随着骨髓腔的压缩以及被称为石骨症（osteopetrosis）的骨变形。

2.11　水通道选择性转运水

关键概念

- 水通道跨细胞膜，能快速和有选择性地转运水。
- 水通道蛋白是四聚体，由四个相同的亚基组成，每个亚基形成一个孔结构。
- 水通道的选择性过滤器有三个主要特征（大小限制、静电排斥和水偶极取向），这造成对水的高度选择性。

水是我们身体的主要成分，可以占到总重量的 70%，水的恰当分布对于保持体液平衡极为重要。水的跨细胞膜运动对于很多生理过程都是重要的。但是，水通过脂双层的被动扩散是不能被调节的，并且其渗透能力相对低和有限。水快速和选择性地跨越细胞膜转运是通过一种特异的跨膜水通道（aquaporin）进行的。从细菌到人，水通道是保守的，组成一个转运蛋白超家族。

在动物中，水通道参与一系列生理过程，包括口渴机制，肾脏中尿的浓集，消化，

体温调节，脊髓液的分泌和吸收，眼泪、唾液、汗液和胆汁的分泌，以及生殖等。例如，肾脏的上皮细胞从初级滤液中重吸收99%的水送回血管，防止脱水。如果身体开始脱水，则肾单位中对渗透压敏感的细胞就会察觉细胞外液体渗透压增加，渗透压增加刺激脑垂体释放加压素（vasopressin）（也称为抗利尿激素）。血浆中高浓度的加压素会导致尿少并且浓度高。加压素与肾集合小管细胞顶膜上的受体结合产生的信号促使水通道蛋白-2快速表达。这是由细胞内的膜泡与上皮细胞的顶膜融合介导的，这些小泡含有水通道蛋白-2。这样，为了应答脱水过程中增加的渗透压梯度，水通道蛋白会增加从尿中吸收水分，送回血液。

水通道是同源四聚体，它们通过渗透压梯度直接调节水的运动。如图2.27所示，每一个亚基都形成一个单独的孔结构，这一点和K^+通道不同，K^+通道的四个亚基形成一个孔结构（见2.5 K^+通道催化选择快速的离子通透）。每个水通道蛋白亚基都包含六个跨膜区段（M1、M2、M4、M5、M6和M8），每三个区段形成串联重复。在每个重复段里连接第二个和第三个跨膜区段的环包含标识基序天冬氨酸-脯氨酸-丙氨酸（NPA），这在所有的水通道中都是保守的。这两个NPA序列在水孔中心并列，作为选择性过滤器的一部分。一个水通道蛋白亚基有极高的单位水渗透度，每秒可以透过3×10^9个水分子，而其他溶质或离子的转运可以忽略不计。值得注意的是，它们有一种多水的通路，可以高速通过水，并且是双向横跨细胞膜，而不能透过普通离子，甚至H_3O^+形式的质子。高度的选择透过性对于肾功能是必需的，因为水和酸同时重吸收会导致致命的酸中毒（acidosis）。

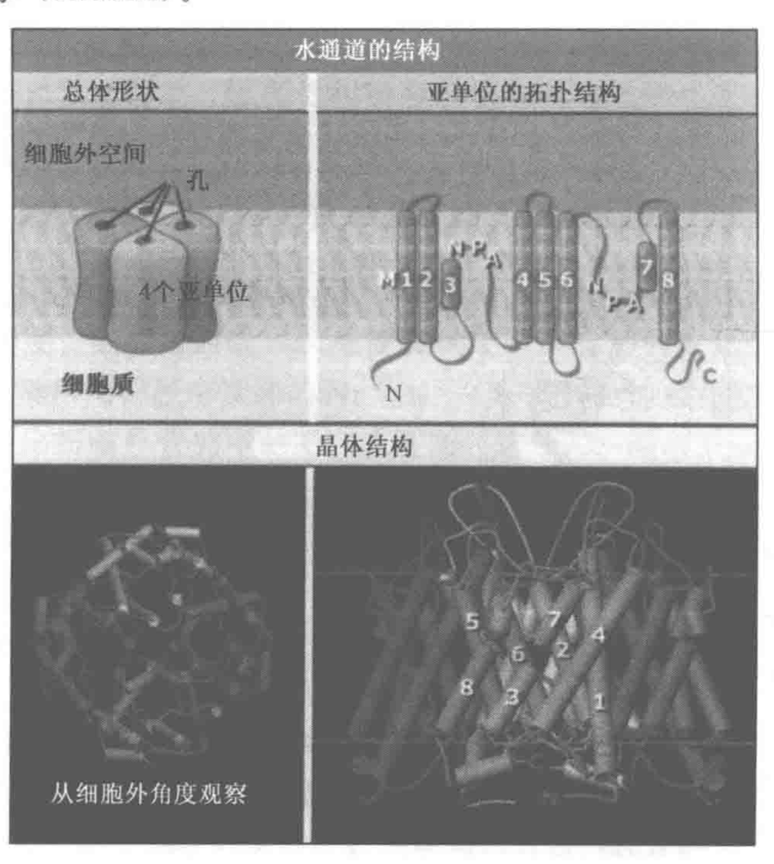


图2.27　一个水通道复合物的X射线晶体结构模式图。复合物包含四个相同的亚基；每个亚基形成一个孔。晶体结构的图片来自于Protein Bank file 1J4N。显示的细胞外视图比侧面视图小。所指出的膜位置是假定的位置。

水通道的孔可以分成三个区域：细胞外孔腔（vestibule），一个狭窄的孔区域，包含有选择性过滤器和一个覆盖 20Å 距离的细胞内孔腔。这三个区域在一起形成一个沙漏形状的水渗透通路。图 2.28（见图版）中重点突出的是构成选择性过滤器的残基。沿着选择性过滤器（selectivity filter）的大多数通道壁是疏水性残基。疏水性残基提供的化学基团是建立选择性水转运通路所必需的。

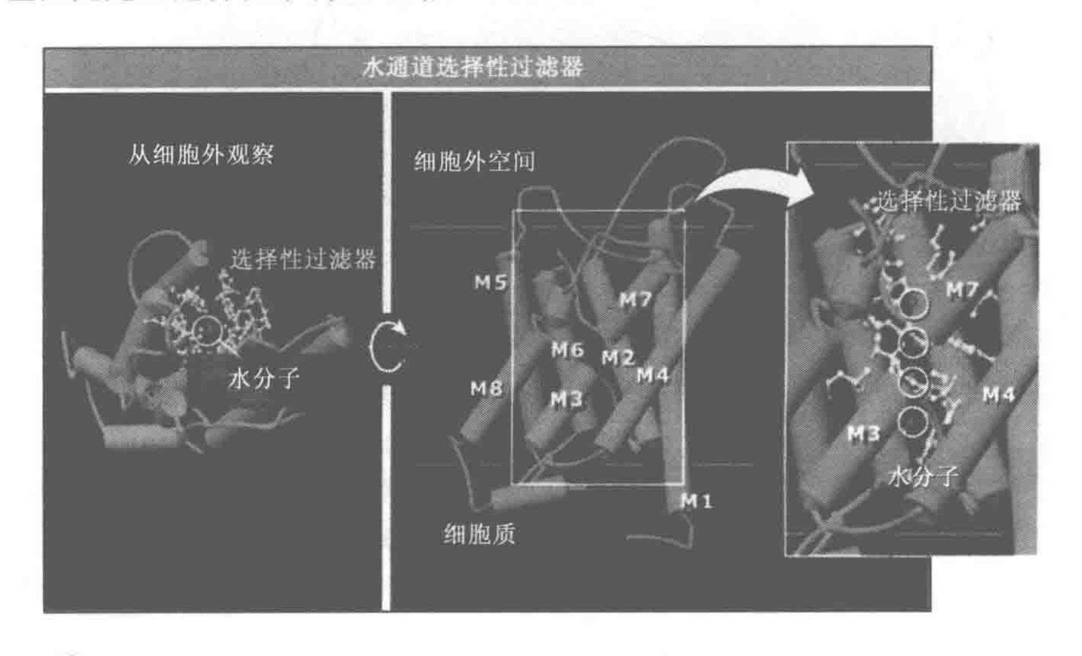


图 2.28　AQP1 水通道一个亚基的 X 射线晶体结构。指出的是膜的假定位置。在原子水平展示了选择性过滤器的残基（黄色）；其余的蛋白质、蛋白质主链以环和螺旋来描绘。图片来自于 Protein Bank file 1J4N。

水通道的孔区域有三个特点，使水渗透具有特异性，如图 2.29 所示的人的 AQP1：

• 大小限制。细胞外孔腔逐渐变细，最窄处的直径只有 2.8Å，这个点被称为限制区域（constriction region）。水分子只能以单行纵队通过限制点，而水合离子和质子则不能通过。

• 静电排斥。排列在水孔的阳离子残基 Arg 197 对带正电荷的分子有静电排斥，并阻止水合氢离子（H_3O^+，来自于水分子的质子化）通过水孔。另外，非跨膜的 α 螺旋 M3 和 M7 也贡献部分阳离子，阻止质子传导。

• 水偶极取向。水偶极重新取向，是通过氢与部分正电荷结合，这些正电荷来自于通道中央 NPA 基序上的两个天冬氨酸残基（Asn78 和 Asn194）侧链，水偶极重新定向促成了选择性。这些电荷与水相互作用，迫使水采取特殊的方位。这种相互作用是 H_3O^+ 进入的第二重障碍。水通道与水结合的能力降低了跨越强疏水通路的能量障碍。但是，这种相互作用的数目和亲和力太弱，不能允许快速地转运水。

水通道选择性过滤器的所有这些特点能使水快速地跨膜转运，而把 H_3O^+ 形式的质子和其他离子排除在外。

不同的水通道异构体对于维持器官和系统水平上的液体内稳态（homeostasis）是必需的。一些水通道异构体在肾脏中表达，功能就是从肾小管中重吸收水。水通道-1 对水的高通透性，在近曲小管（proximal convoluted tubule）和 Henle's 襻细降支（descending thin limbs of the loop of Henle）上皮细胞中是基本要素。在人体中，水通道-1

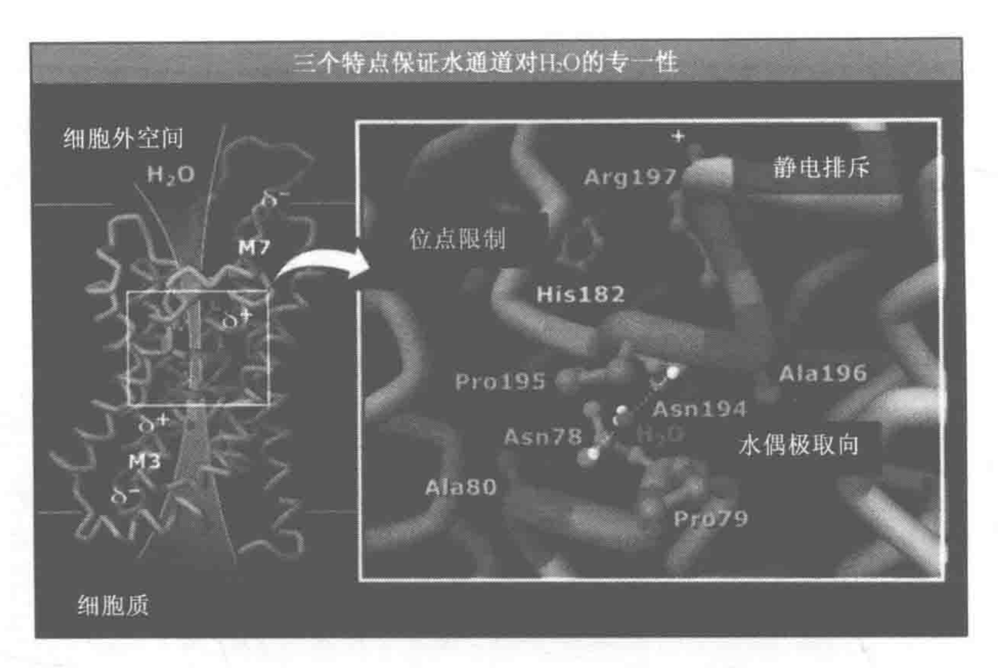


图 2.29　水通道水孔区域有三个特点，造成水渗透的选择性。在插图中，只展示了一个正在渗透的水分子的晶体结构；它的氧原子与两个天冬氨酸的两个侧链形成氢键。这些晶体结构图片来自于 Protein Bank file 1J4N。

蛋白帮助把每天 180L 的血液滤液浓缩为每天 1.5L 的尿液，从最初的血浆滤液中重吸收了将近 178.5L 的水并经由细胞顶膜送回到血管［水也经由细胞外侧通路（paracellular pathway）被重吸收］。水通道-1 有遗传缺陷的患者不能有效地浓缩他们的尿液。水通道-2 在肾脏上皮细胞中的表达与水通道-1 的表达是不同的。前面提到过，血管加压素刺激水通道-2 在集合小管处表达，导致尿浓度增加。饮酒或咖啡所致的过量的水分吸收或抑制血管加压素的释放，导致肾分泌大量稀释的尿。患有肾性尿崩症（nephrogenic diabetes insipidus）的患者水通道-2 有遗传缺陷，每天排尿达到 20L。在大脑中，靠近小血管的细胞表达水通道-4，调节脑实质（brain parenchyma）和血管腔之间水的运动。水通道-4 是一个潜在的药理学靶点，帮助快速缩减脑水肿，使患者能从头部外伤或中风中复原。水通道-0 只在晶状体（lense）的纤维细胞中表达，它的无义突变会引起儿童患先天性白内障（congenital cataracts）。

2.12　动作电位是依赖多种离子通道的电信号

关键概念

- 动作电位使细胞间实现快速通信。
- Na^+、K^+ 和 Ca^{2+} 流是动作电位的关键要素。
- 通过电压依赖的 Na^+ 通道进入细胞的 Na^+ 流介导膜去极化。
- 通过几种不同类型的 K^+ 通道转运的 K^+ 使膜复极化。
- 器官的电活动可由动作电位载体的总和检测。
- 动作电位的改变增加了心律失常（arrhythmias）或癫痫（epilepsy）的易感性。

神经元、肌肉细胞和内分泌细胞都是可兴奋细胞，因为它们可以产生或应答电信号。这些细胞的膜电位经历了快速和瞬时的变化，这种变化转换成电信号，像沿着神经

元的轴突传播的神经冲动或诱导肌肉收缩的信号。电信号被称做**动作电位（action potential）**。在脑中，知觉（perception）参与处理大量广泛分布的动作电位，这些电位出现在刺激到达之前、之中及之后，并且有不同的时空模式（spatiotemporal pattern）。在骨骼肌和心脏中，动作电位对引发和协调细胞的同时收缩是关键性的。动作电位的振幅（amplitude）和持续时间（duration）可以用电生理技术测量。在神经元中，动作电位持续几毫秒，而在心肌中，动作电位持续几百毫秒。心脏动作电位较长的持续时间对协调产生心脏收缩的上百万个肌肉细胞的激活是必需的（见 2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。动作电位可以以每秒数米的速度沿着细胞膜传播，从而允许细胞之间快速、长距离的交流，并形成像脑和心脏中那些复杂的生理功能的基础。

跨细胞膜的电位在动作电位的产生中起着关键性作用。静息的细胞维持一个负的膜电位，也就是说，细胞内侧比细胞外侧电荷稍负。这个静息膜电位大部分是由 Na^+/K^+-ATPase 和 K^+ 渗漏通道来维持的，Na^+/K^+-ATPase 每泵出三个 Na^+ 离子，就泵进两个 K^+ 离子（见 2.4 跨细胞膜的电化学梯度产生膜电位和 2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度）。

在电生理测量的基础上，50 多年前就提出了动作电位机制的模型（见EXP：2-0001）。这个模型包括两个关键要素，两个都贡献于动作电位的产生：

- 细胞膜对 Na^+ 或 K^+ 的选择性渗透力经历了短暂的和有顺序的变化，并且
- 这些选择性渗透力的变化取决于膜电压。

动作电位由几种不同类型的离子通道的协调激活和失活来介导。电压门离子通道快速感知和应答细胞膜电位变化的能力，可能使细胞膜的电信号得以产生。不同类型的离子通道的打开和关闭在动作电位的不同阶段连续发生，如在图 2.30 中所示的心肌细胞。膜电位的快速变化是由于离子浓度局部的跨膜变化，而对细胞内离子的总浓度影响不大。

动作电位开始时有一个快速的上升期（阶段 0），此阶段由电压门 Na^+ 通道打开引发，允许 Na^+ 流顺着它们的浓度梯度快速地进入细胞（见图 2.30）。Na^+ 的这种运动的结果是膜去极化（depolarization），此时细胞内环境比细胞外带有更多的正电荷（电压门 Na^+ 通道的细节见 2.7 电压依赖的 Na^+ 通道被膜去极化激活并转换电信号）。

当 Na^+ 通道经历快速失活时，去极化在几毫秒内停止，早期的复极化（repolarization）在阶段 1 开始。当电压门 Na^+ 通道在心脏中关闭时，电压门 Ca^{2+} 通道打开，并且在膜去极化过程中，当膜电位更正的时候，瞬时的向外钾流被激活，使膜电位处于一个新水平。这个水平是在阶段 2，由去极化和复极化膜电流之间错综复杂的平衡决定的。在 Na^+ 通道再次激活之前，Na^+ 通道需要复极化从失活状态中恢复。Na^+ 通道的一小部分不能进入失活状态，而是产生一股小而持续的 Na^+ 流，与持久的向内的 Ca^{2+} 流一起，延长心脏动作电位去极化状态。与神经元动作电位相比，心脏动作电位相对较长。更长的动作电位似乎是必要的，它使得有足够的时间激活细胞内 Ca^{2+} 的释放来引发肌肉收缩，以及防止在细胞内 Ca^{2+} 释放期间异常的膜去极化（见 2.13 兴奋-收缩耦联激活心脏和骨骼肌）。

在较大型的动物和人类中，动作电位的阶段 1 和 2 被一个 V 字形凹口分开。在阶段 2，平台期，几种不同类型的 K^+ 通道的相继激活允许 K^+ 离开细胞。退出细胞的 K^+

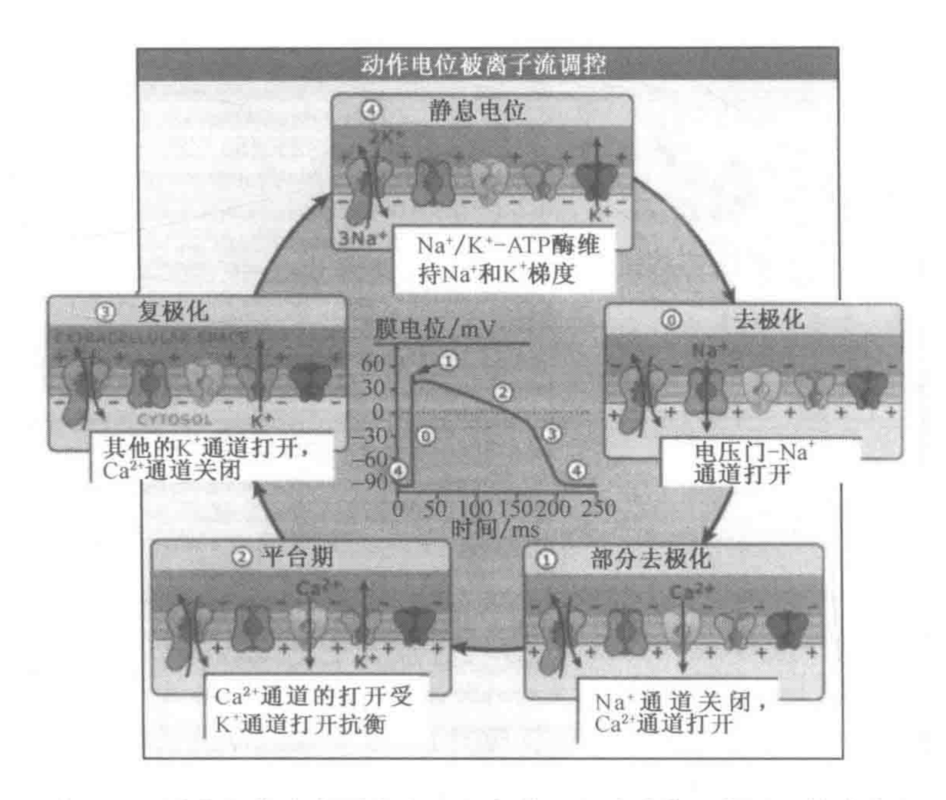


图 2.30　动作电位由离子流产生和介导。心脏动作电位可以被分为 5 个阶段。每一个阶段都有不同组的离子通道打开或关闭。在动作电位的不同阶段打开或关闭不同类型的 K^+ 通道，这并不是很特异的。在整个动作电位期间 Na^+/K^+-ATPase 都在泵出泵入离子，但随着膜电势变化，泵的速度也跟着改变。

离子迅速地抗衡由 Na^+ 通道和 K^+ 通道携带进细胞的正电荷离子。更有 Na^+/Ca^{2+}-交换器（Na^+/Ca^{2+}- exchanger）从胞质溶胶中排出 Ca^{2+}，因而产生了一个去极化的向内的电流（见 2.16 跨膜的 Na^+ 梯度对于很多转运体的功能是必需的）。另外，Na^+/K^+-ATPase 连续地外排三个 Na^+ 来交换两个 K^+ 进入细胞，驱动膜电位走向复极化（阶段 3）。不同的离子通道相配合的打开和关闭活动终止了动作电位，并建立起静息的负膜电位（阶段 4）。高速的离子渗透对于终止一个动作电位是必不可少的，并且 K^+ 通道允许快速的离子流动的同时维持对离子的选择性（见 2.5 K^+ 通道催化选择性和快速的离子扩散）。例如，在神经元中，上百万个 K^+ 在 1ms 内退出细胞来快速地终止一个动作电位。

大量的、各种各样的电压门 K^+ 通道造成在不同类型的细胞中有特征性的电信号。例如，向内的“整流器”（inward rectifier）K^+ 通道，对稳定的静息膜电位以及心脏动作电位的长的平台阶段都是必需的。在正的膜电位中，向内的整流器 K^+ 通道大部分被关闭，允许更持久的膜去极化（向内的整流器 K^+ 通道的细节见 2.25 补充：大部分的 K+通道都经历整流）。在心肌细胞（cardiac myocyte）中，当膜电位变得更正，超过 −40mV 时，开始仅有很少 的 K^+ 流动。这维持了起去极化作用的向内的 Na^+ 和 Ca^{2+} 流对动作电位持续时间的影响，直到在一定时间后，延迟的整流器 K^+ 通道被激活，才驱动膜电位转向静息状态（见图 2.30）。

由脑中所有的神经元、一个肌肉群中的所有肌细胞或者心脏中的所有心肌细胞的个

别动作电位产生的电活动的总和，能被分别放大成为可视的脑电图（EEG）、肌电图（EMG）或心电图（ECG）。这些电活动的表面记录被用来调制异常症状，如癫痫症（epilepsy）的失控的电活动、肌强直（myotonias）或心律异常（arrhythmias）。这些异常来自于影响特定类型离子通道功能的突变。

电压依赖的 Na^+、K^+ 或 Ca^{2+} 通道的突变伴随着脑和心脏功能的异常。例如：编码心脏电压依赖的 Na^+ 通道的 *SCN5A* 基因的突变与一些心脏疾病相关联。*SCN5A* 基因的一些获得性功能突变（gain-of-function mutation）会引起长 QT 综合征（QT syndrome），因不完全的 Na^+ 通道失活导致动作电位拉长。另外，心脏 $Ca_v1.2$ 通道决定动作电位的平台期，它的突变也会导致长 QT 综合征和心率失常。上述这两种疾病都会发生心脏复极化延迟，由于心率失常而增加猝死的风险。电压依赖的 Na^+ 通道的其他突变也会引发不同形式的心脏疾病、骨骼肌偏瘫或多种遗传性癫痫。HERG K^+ 通道基因的突变是电压门控 K^+ 通道与心脏病相关联的一个例子。这个突变增加了通道失活的速率，这样就降低了出细胞的 K^+ 流，并且减慢了动作电位的复极化期。这样，K^+ 通道基因的这种突变就延长了动作电位，这与编码电压门 Na^+ 通道的基因的一些突变的效应是相似的。

2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌

关键概念

- 兴奋-收缩耦联过程由膜的去极化引发，控制肌肉收缩。
- 兰尼碱（ryanodine）受体和 1，4，5-三磷酸肌醇受体是 Ca^{2+} 通道，Ca^{2+} 通过它由细胞内的 Ca^{2+} 库（intracellular store）释放到胞质溶胶中。
- 细胞内的 Ca^{2+} 通过肌质网膜上的兰尼碱受体释放，刺激肌丝收缩。
- 一些不同类型的 Ca^{2+} 转运蛋白，包括 Na^+/Ca^{2+} 交换器（Na^+/Ca^{2+}-exchanger）和 Ca^{2+}-ATPase，对于降低细胞质中 Ca^{2+} 浓度和控制肌肉舒张都是重要的。

Ca^{2+} 是不同类型的细胞中众多信号通路的**第二信使（second messenger）**。在高等生物中，细胞内的 Ca^{2+} 介导很多不同的过程，如突触传递、肌肉收缩、胰岛素分泌、受精过程和基因表达。在本节，我们将讨论 Ca^{2+} 信号怎样调节肌肉收缩和心脏的心率（肌肉收缩中细胞骨架的作用的细节见第 8 章肌动蛋白）。膜去极化产生肌肉张力的过程被称为**兴奋-收缩耦联（excitation-contraction coupling）**。这是控制骨骼和心肌功能的基本机制。静止的肌肉细胞中维持着胞质溶胶的低浓度自由 Ca^{2+}（$\sim10^{-7}$ mol/L），比细胞外（$\sim10^{-3}$ mol/L）和肌质网中的 Ca^{2+} 浓度低得多。在兴奋-收缩耦联开始的时候，Ca^{2+} 进入胞质溶胶中，然后当细胞转入静息状态时就离开胞质溶胶。这种胞质溶胶中 Ca^{2+} 浓度的瞬时增加和降低过程被看作是胞内 Ca^{2+} 瞬变（transient）。这个过程需要几种不同类型的 Ca^{2+} 转运蛋白参与。

兴奋-收缩耦联的过程可以被分为四个阶段，如图 2.31 所示的心肌细胞中那样。首先（第一阶段），信号在肌膜（sarcolemma）上被引发，这时膜经历去极化，由于动作电位来到，膜电位比静息状态时更正（见图 2.30 和 2.12 动作电位是依赖几种类型的离

子通道的电信号)。电压依赖的 Ca^{2+} 通道(叫做 $Ca_v1.2$ Ca^{2+} 通道)能感受到膜电位的这种变化，在应答心肌动作电位的第二阶段时打开，允许一股小的 Ca^{2+} 流顺着它们的电化学梯度进入细胞(电压依赖的 Ca^{2+} 通道的细节见 2.9 质膜上 Ca^{2+} 通道激活细胞内的功能)。

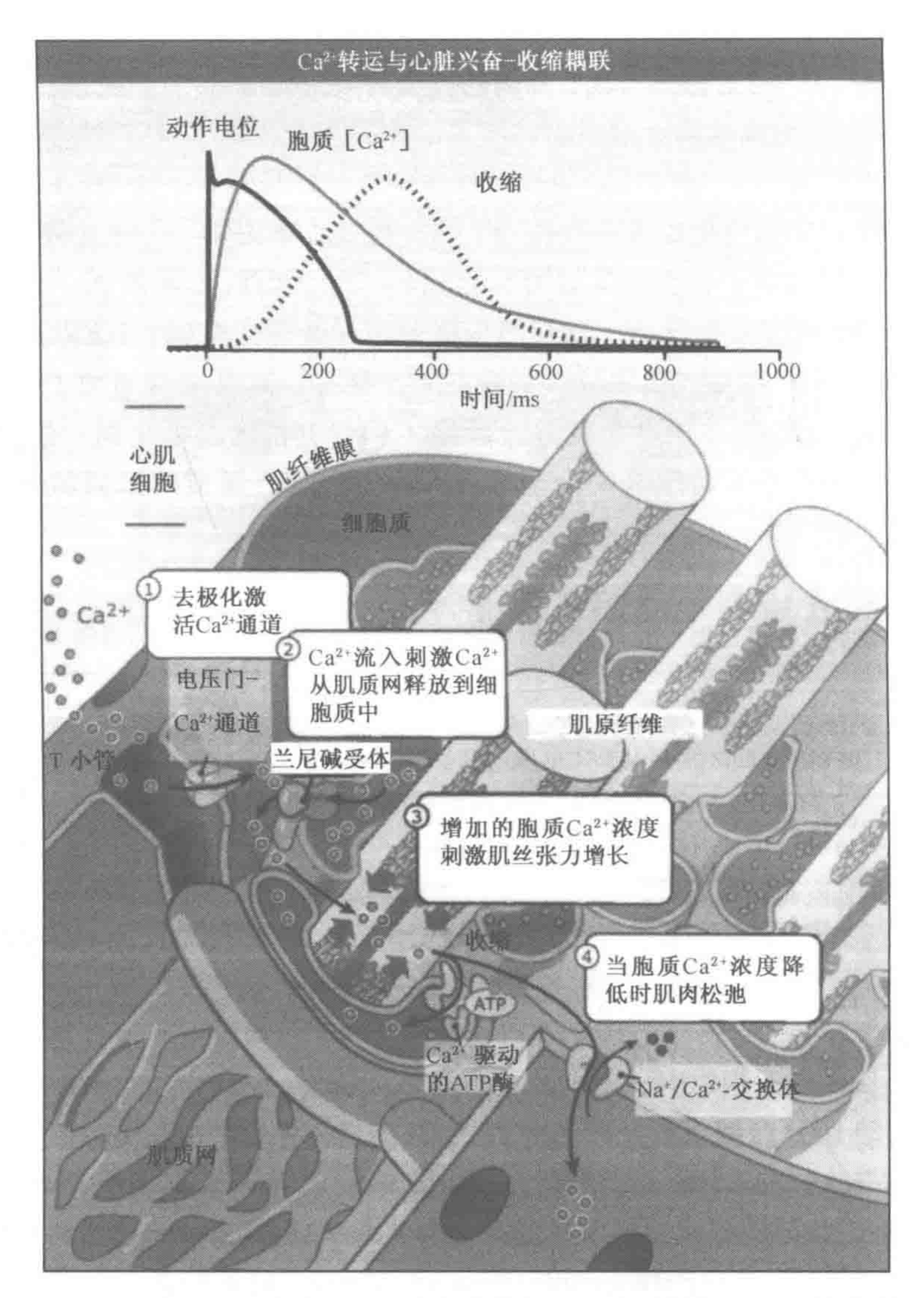


图 2.31　在心肌细胞的一个动作电位期间，几种不同类型的 Ca^{2+} 转运蛋白发挥作用，增加和降低胞质溶胶中的 Ca^{2+} 浓度。

第二阶段，Ca^{2+} 经由 $Ca_v1.2$ 通道内流，刺激 Ca^{2+} 从肌质网中释放，肌质网中储存有毫摩尔浓度的 Ca^{2+}。从肌质网中释放 Ca^{2+} 是通过细胞内的 Ca^{2+} 释放通道，被称为兰尼碱受体(ryanodine receptor，RyR)进行的。心脏中细胞内 Ca^{2+} 经由 RyR 释放的过程被称为 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放。从肌质网中释放入胞质溶胶的 Ca^{2+} 量比跨过肌膜(sarcolemma)进入胞质溶胶的 Ca^{2+} 量大好几倍。心脏肌质网中的 Ca^{2+} 敏感的 Ca^{2+} 通道之所以被称为兰尼碱受体，是因为它们可以以很高的特异性结合植物中的兰尼碱，可

以阻断通道。不同的细胞中表达不同的细胞内 Ca^{2+} 释放通道，它们在应答不同的刺激时打开，以调节肌肉收缩。心肌细胞中，肌质网上主要的细胞内 Ca^{2+} 释放通道就是 RyR2 异构体。

第三阶段，细胞液中 Ca^{2+} 浓度的增加激活 Ca^{2+} 敏感的肌钙蛋白 C（tropornin C），肌钙蛋白 C 刺激肌丝（myofilament）收缩。肌浆中 Ca^{2+} 浓度从 100nmol/L 增加到大约 1.0μmol/L，对于有效地激活细胞内全部肌丝及心脏的肌肉同时收缩是必需的。

第四阶段，当 Ca^{2+} 从胞质溶胶中排出时，肌肉舒张。有几种不同的机制把 Ca^{2+} 从胞质溶胶中挤出去。主要的途径是由肌质网上的 Ca^{2+}-ATPase 泵重吸收 Ca^{2+}，使其进入肌质网中的 Ca^{2+} 库（Ca^{2+} store）储存。这个泵是大量的经由 RyR 从肌质网的钙库中释放的 Ca^{2+} 被重吸收的原因（Ca^{2+}-ATPase 的细节见 2.18 Ca^{2+}-ATPase 把 Ca^{2+} 泵入细胞内的储存隔室）。另外，Ca^{2+} 转运蛋白，如像质膜上的 Na^+/Ca^{2+} 交换器，把 Ca^{2+} 从胞质溶胶中转移出去。这个交换器可以把通过电压依赖的 $Ca_v1.2$ Ca^{2+} 通道从细胞外进入的一小部分 Ca^{2+} 挤出去。

总体上，骨骼肌和心肌中的兴奋-收缩耦联过程是很相似的，只有一些例外。与心肌相比，骨骼肌质膜上的电压依赖的 Ca^{2+} 通道是一个不同的异构体，通过与骨骼肌的 RyR 异构体——RyR1 的物理上的相互作用来刺激 Ca^{2+} 从肌质网中释放。另外，骨骼肌通过募集更多独立的肌肉细胞（肌纤维）被逐渐激活，这样将逐步增加收缩的力量。骨骼肌收缩的激活，在极度的短的单收缩和重复性收缩之间渐次变化，这种重复性收缩产生持续不断的或僵直的应力，最终由于肌肉疲劳而停下。

细胞内 Ca^{2+} 释放通道在离子通道中是独一无二的。它们可以被分为两组，RyR，它可被 Ca^{2+} 门控或通过直接与质膜上的 Ca^{2+} 通道相互作用而被门控，另一组是与其有密切关系的 1,4,5-三磷酸肌醇受体（IP_3R），IP_3R 是由 IP_3 门控的。四个 RyR 或 IP_3R 亚基聚集成一个四重的对称的复合物来形成一个通道，如图 2.32 所示的 IP_3R。这两种

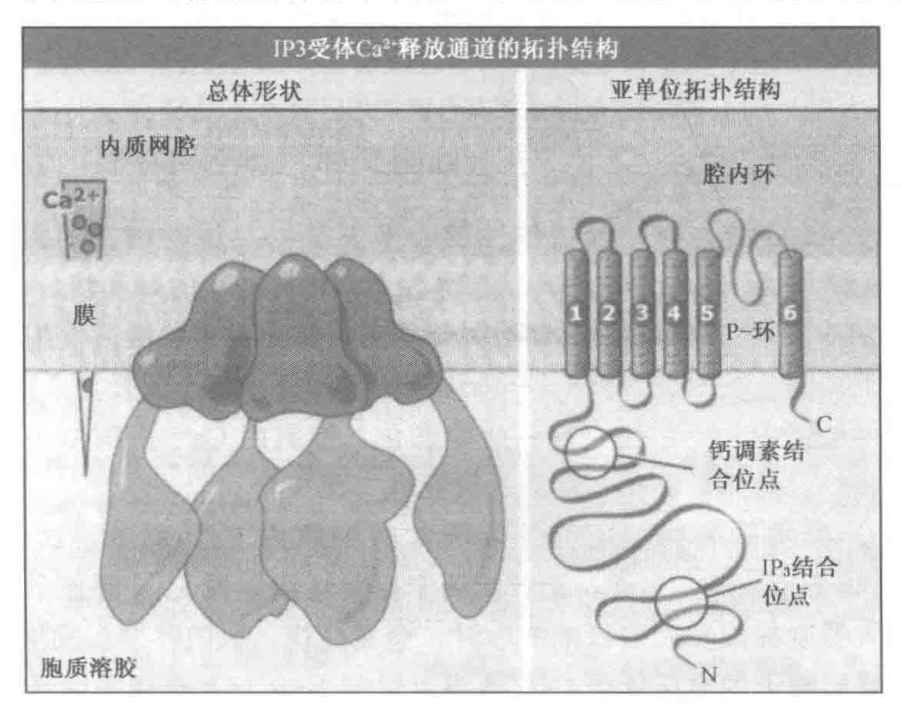


图 2.32 设想的内质网上 1,4,5-三磷酸肌醇受体的结构。左边的插图（三角形）指明了静息的动物细胞中内质网上 Ca^{2+} 离子的跨膜梯度。

类型的通道都能被分为两个区域：孔道区域和较大的细胞质区域，后者参与门控通道孔。预计 IP_3R 有六个跨膜区段，每个亚基有一个孔环（pore loop），并且与 RyR 有相似的拓扑结构。

RyR Ca^{2+} 通道是已知的最大的离子通道。RyR 的区域结构已经用电镜所得的三维重建近似拟合。RyR Ca^{2+} 通道比 Ca^{2+}、Na^+ 或 K^+ 通道约大 10 倍，如图 2.33（见图版）所示。每个 RyR 亚基大约有 5000 个氨基酸，大小几乎是部分同源的 IP_3R 亚基的两倍。RyR 和 IP_3R 的孔道区域与 K^+ 通道的孔道区域差不多同样大小。RyR 和 IP_3R 较大的细胞质区域分别由 Ca^{2+} 离子或 IP_3 控制着通道的门，这与配体门 K^+ 通道相似（见 2.6 不同的 K^+ 通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制）。

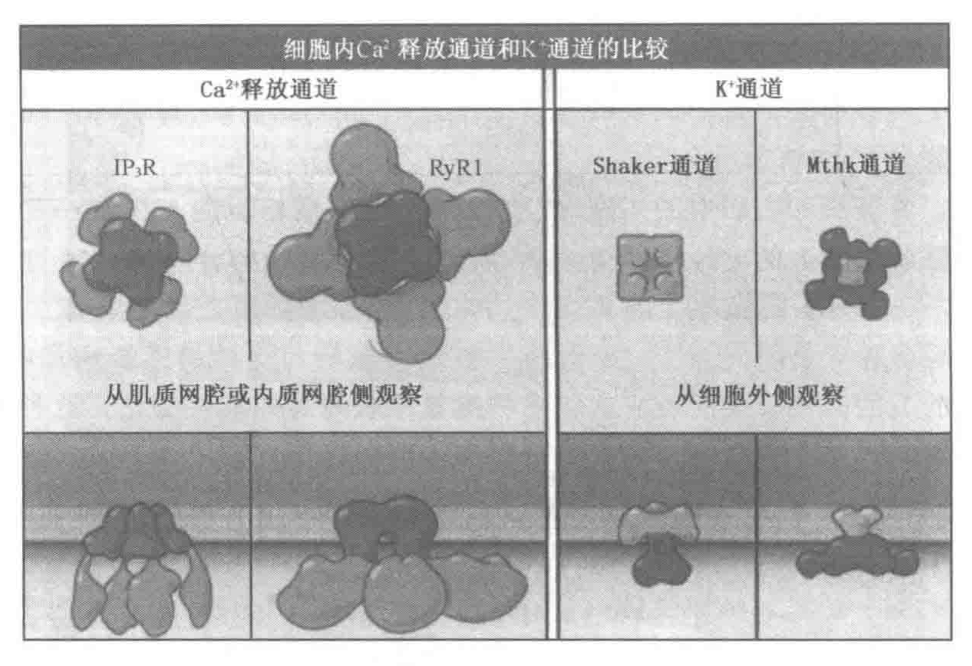


图 2.33　两种细胞内 Ca^{2+} 释放通道，IP_3 受体（IP_3R）和兰尼碱受体（RyR）；两种 K^+ 通道，电压依赖的 Shaker 通道和 Ca^{2+} 门控 MthK 通道，它们在大小上不同。孔的区域分别用蓝色或黄色标明。

影响细胞内 Ca^{2+} 释放通道的突变引起不同形式的疾病。例如，心脏 RyR2 的无义突变（missense mutation）与两种遗传性的心率失常以及运动诱发的猝死有关。RyR Ca^{2+} 通道的突变会降低与 calstabin2（也被称为 FKBP12.6）的亲和性。calstabin2 是一个 Ca^{2+} 通道亚基，它能稳定心脏 RyR 的关闭状态，防止异常的激活发生。RyR 突变的后果是增加心脏在静息状态或舒张阶段 Ca^{2+} 从肌质网的渗漏。此外，心脏疾病中 RyR2 的调节障碍看来可诱发猝死和使心脏的故障恶化。细胞内 Ca^{2+} 渗漏似乎是一种普遍的机制，可以引起异常的膜去极化，能触发致死性心率失常。

骨骼肌 RyR 异构体的突变也会导致异常的细胞内 Ca^{2+} 释放，这与恶性高热病（malignant hyperthemia）有关联。患者受到非控制性细胞内 Ca^{2+} 释放的影响，如果暴露在一定的吸入类麻醉剂和肌肉松弛剂中时，会发高烧，肌肉收缩和发生威胁生命的代谢危机。骨骼肌质膜上的电压依赖 Ca^{2+} 通道可以与 RyR 相互作用并激活 RyR，编码骨骼肌质膜上的电压依赖 Ca^{2+} 通道基因的突变，也会引发易感恶性高热。

2.14 一些葡萄糖转运蛋白是单向转运体

关键概念

- 为了跨越血脑屏障，葡萄糖跨越小血管的内皮细胞（endothelial cell）被转运到星形胶质细胞（astrocyte）。
- 葡萄糖转运蛋白是单向转运体，顺着浓度梯度转运葡萄糖。
- 葡萄糖转运蛋白经历了构象变化，导致其跨膜的底物结合位点的重定向。

葡萄糖是真核细胞主要的能源物质，很多细胞靠不断地供应葡萄糖作为产生 ATP 的主要来源。葡萄糖是一种极性分子，以水化形式存在，细胞膜相对地可以透过小的极性分子，比如糖类。这样，转运葡萄糖进入细胞就需要特定的膜蛋白。两个不同的基因家族的成员实现葡萄糖的跨质膜转运。葡萄糖转运体（GLUT）是单向转运体，介导葡萄糖跨质膜的促进转运（facilitated transport）。与 GLUT 蛋白相比，Na^+/葡萄糖共转运体（cotransporter）耦联跨膜 Na^+ 梯度所特有的能量来转运葡萄糖（见 2.16 跨膜的 Na^+ 梯度对于很多转运体的功能是必需的）。在本节，我们将讨论 GLUT 蛋白。

GLUT 蛋白家族是主要的促进者超家族（major facilitator superfamily，MFS）的一部分，它是参与膜转运的最大的蛋白超家族，并且在所有活的生物体中是普遍存在的。GLUT 蛋白在所有真核细胞中是膜内在蛋白。不同的 GLUT 转运蛋白的异构体的动力学性质（kinetic property）、糖特异性、组织定位以及调节方式不同。除了葡萄糖，一些 GLUT 蛋白还转运其他底物，如半乳糖、水、糖肽类止痛剂等。GLUT 蛋白是单向转运体，顺着它们的浓度梯度跨膜转运溶解的物质（见图 2.4）。这样一来，GLUT 蛋白介导溶解物进出细胞取决于溶解物的浓度。葡萄糖通过 GLUT 蛋白进入细胞通常是细胞进行高能量代谢的限速步骤。

营养物质如糖类，是经血管被转运进器官中的。沿着小血管壁排列的内皮细胞（endothelial cell）控制营养物质的交换。在这些内皮细胞上 GLUT 蛋白含量丰富，尤其是在血脑屏障的内皮细胞中。脑有很高的代谢需求，需要吸收葡萄糖，并且脑的功能对于营养物的降低尤其敏感。这种通过脑微血管将葡萄糖转运进神经组织的高度的能力是分几步完成的，涉及通过 GLUT-1 异构体的转运，如图 2.34 所示。GLUT-1 在内皮细胞膜与血管的交界面、细胞之间空间以及星形胶质细胞的质膜上表达，星形胶质细胞对于血脑屏障功能是非常重要的。在这些位点的 GLUT-1 蛋白将葡萄糖从血管中转运进内皮细胞，出内皮细胞，并进入星形胶质细胞。星形胶质

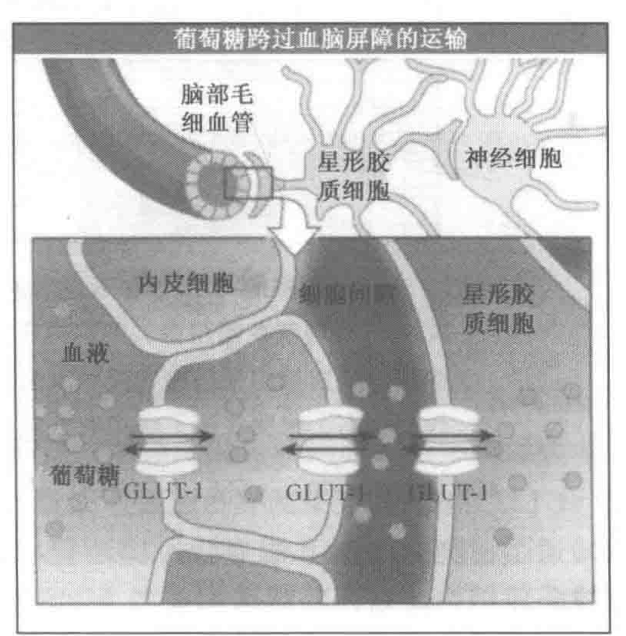


图 2.34 葡萄糖跨过血脑屏障的选择性运输，是通过葡萄糖转运蛋白异构体 1（GLUT-1）实现的。葡萄糖从血液运输到脑和中枢神经系统需要几种细胞的参与并涉及多步骤的机制。

细胞把葡萄糖转化为其他形式的能源物质，这些能源物质被转运进神经元。

在不同的组织中，其他 GLUT 异构体也是重要的。例如，GLUT-4 介导肌肉和脂肪组织对葡萄糖的吸收。在进食期间和之后，胰岛素的一个功能就是增加这些组织细胞对葡萄糖的吸收。GLUT-4 异构体也叫做胰岛素应答转运蛋白（insulin- responsive transporter），被调整转运到细胞表面。GLUT-4 蛋白定位在细胞内的小泡内，这些小泡与质膜融合，把 GLUT-4 转运蛋白投放到质膜上来增加葡萄糖的转运能力。胰岛素与细胞表面受体结合触发了细胞内信号级联反应（signaling cascade），导致这些小泡与细胞质膜快速融合。这反过来又使葡萄糖通过 GLUT-4 转运到细胞内的量迅速增加。在Ⅱ型糖尿病（diabete）中，从血液中吸收葡萄糖到肌肉和脂肪组织的这个过程受损，显然是由于靶向定位到质膜的 GLUT-4 减少（调节性分泌的细节见 4.19 某些细胞储存蛋白质用于分泌）。另外，GLUT-2 从葡萄糖合成的器官如肝脏中把葡萄糖运出。

图 2.35 展示的是 GLUT 转运蛋白的拓扑结构，与其他 MFS 膜上的转运蛋白相似。基于亲疏水性（hydropathy）序列分析，预告 GLUT-1 转运蛋白有 12 个跨膜的 α 螺旋，带有在细胞内的 N 端和 C 端及细胞内环（intracellular loop）。细胞内环包括底物结合位点和磷酸化位点。

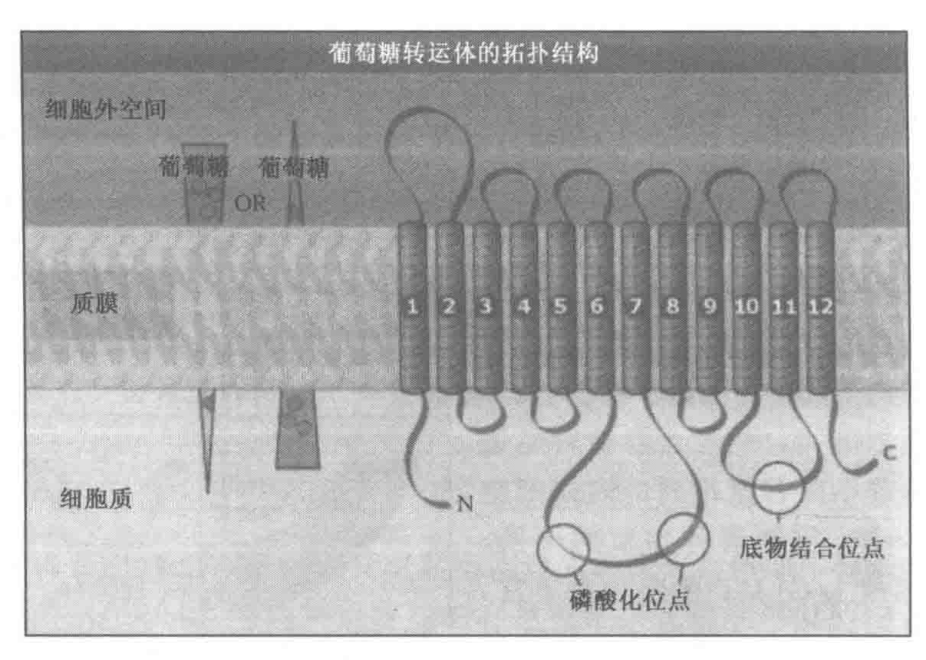


图 2.35　预测的 GLUT 转运蛋白的拓扑结构中包含 12 个跨膜区段，其 N 端和 C 端都在细胞内。细胞内环含有磷酸化位点和底物结合位点。插图指出跨质膜的葡萄糖梯度可以出现在任一方向，这取决于细胞类型和代谢状态。梯度表明了转运的方向。

GLUT-1 结构模型的提出是基于位点专一诱变（site-directed mutagenesis）和测量在转运蛋白突变情况下葡萄糖的转运量，以及细菌乳糖透酶（lactose permease）的 X 射线晶体结构。细菌乳糖透酶是与 MFS 相关的一员，在寡聚糖/H^+转运体亚家族中。（见 2.15 同向转运体和反向转运体介导耦联转运）。在这个模型中，跨膜螺旋的方位（orientation）使形成的孔道腔室可供葡萄糖透过，并允许 GLUT 蛋白和葡萄糖之间形成氢键，如图 2.36 所示。红细胞中葡萄糖转运的动力学分析表明了一种机制，那就是 GLUT 蛋白在两种主要的构象（conformation）之间变换。这种机制与已提出的细菌乳

糖透酶机制相似（见图 2.39）。一种构象是葡萄糖的结合位点面向细胞外空间，而另一种则是面向胞质。葡萄糖结合在任一面都将诱导构象改变，导致葡萄糖结合位点重新定位到膜的对面，以及葡萄糖的释放。这样，尽管 GLUT 转运体是单向转运体，细菌乳糖透酶是同向转运体，但我们认为它们以相似的机制运作。

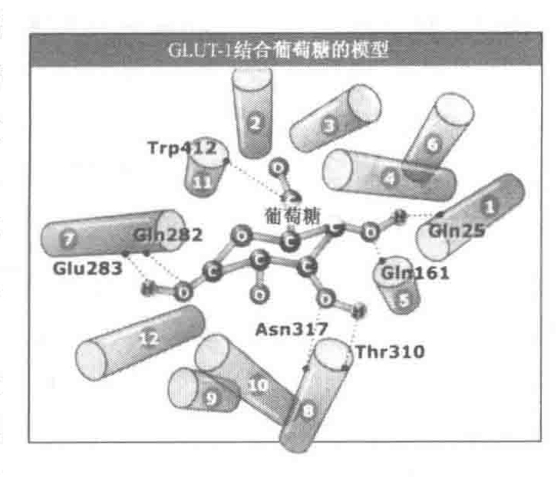


图 2.36 预测的葡萄糖转运蛋白 GLUT-1 的跨膜 α 螺旋的方位。图中指明了参与葡萄糖结合的残基（葡萄糖分子没有被标出）。是从质膜的细胞内侧观察螺旋的。以大肠杆菌的乳糖透酶结构作为模板，提出了这个同类的模型。

GLUT-1 基因的突变可导致重大的发育缺陷。儿童的脑对葡萄糖的需求量是成人的 3～4 倍，达到身体对葡萄糖利用的 80%。人类 GLUT-1 基因的突变与 GLUT-1 缺陷综合征相关联，这种综合征是一种罕见的疾病，特征是癫痫发作（seizures）和发育延迟，被认为是由于葡萄糖转运进脑减少引起的。在小鼠中，胚胎 GLUT-1 缺陷的小鼠生长迟缓并且发育畸形。类似的畸形在母鼠患糖尿病的小鼠胚胎中也发现过，因为母鼠过量的血糖浓度抑制了胚胎器官中 GLUT-1 的表达。

2.15 同向转运体和反向转运体介导耦联转运

关键概念

- 细菌乳糖透酶的功能是作为一个同向转运体，耦联乳糖和质子的跨质膜转运。
- 乳糖透酶利用电化学质子（H^+）梯度，驱使乳糖积聚在细胞内。
- 乳糖透酶也能利用乳糖梯度来建造跨膜的质子梯度。
- 乳糖透酶的转运机制很可能涉及向内（inward）和向外构型（outward configuration），这些构型允许底物结合到膜的一侧并在另一侧释放。
- 细菌 3-磷酸甘油转运体（glycerol-3-phosphate transporter）是一种反向转运体，在结构上与乳糖透酶有关系。

转运体蛋白是膜蛋白，促进分子跨过膜的双层（见图 2.4）。单向转运体（uniporter）使溶解物顺着跨膜浓度梯度移动（见 2.14 一些葡萄糖转运体是单向转运体）。同向转运体（symporter）和逆向转运体（antiporter）使溶解物逆着它们的浓度梯度运动，这种运动的动力是来自与第二种溶质顺着其跨膜浓度梯度的运动耦联。很多转运体都是转运蛋白的主要促进者超家族（MFS）的一部分，它们转运糖类、磷酸糖类、药物、神经递质、核苷酸、氨基酸、多肽以及其他跨膜物质。在本节，我们将讨论两个 MFS 转运蛋白：一个是细菌乳糖透酶 LacY，它的功能是作为一个单体的寡糖/H^+ 同向转运体（monomeric oligosaccharide/H^+ symporter），另一个是细菌 3-磷酸甘油转运体 GlpT（glycerol-3-phosphate transporter GlpT），是一个反向转运体。

LacY 是第一个被分离的编码膜转运蛋白的基因（乳糖利用的调节的细节见

MBIO：2-0001)。LacY 同向转运体利用 H^+ 顺着它们的浓度梯度转运所释放的自由能（通常会使细胞质变碱）驱动营养物质如乳糖，逆着它们的浓度梯度积聚，如图 2.37 所示。呼吸链和 F_1F_0-ATPase 的活动建立起跨细胞质膜的 H^+ 梯度，F_1F_0-ATPase 把 ATP 水解和质子转运出细胞耦联起来（见 2.20 F_1F_0-ATP 合酶将 H^+ 运动与 ATP 合成或水解耦联起来）。对 LacY 来说，乳糖和 H^+ 转运的化学计量（stoichiometry）是 1∶1，这两种底物以相同的方向运动。但是，乳糖和质子的共转运（cotransport）也可以是任一方向的，这取决于跨膜梯度的方向。这样，乳糖梯度可以驱动质子的向上移位（uphill translocation）并产生一个向内或向外的 H^+ 梯度，这取决于乳糖浓度梯度的方向。在缺乏显著的电化学 H^+ 梯度时，乳糖和质子的共转运可以在任一方向发生，这取决于跨膜乳糖梯度的方向。

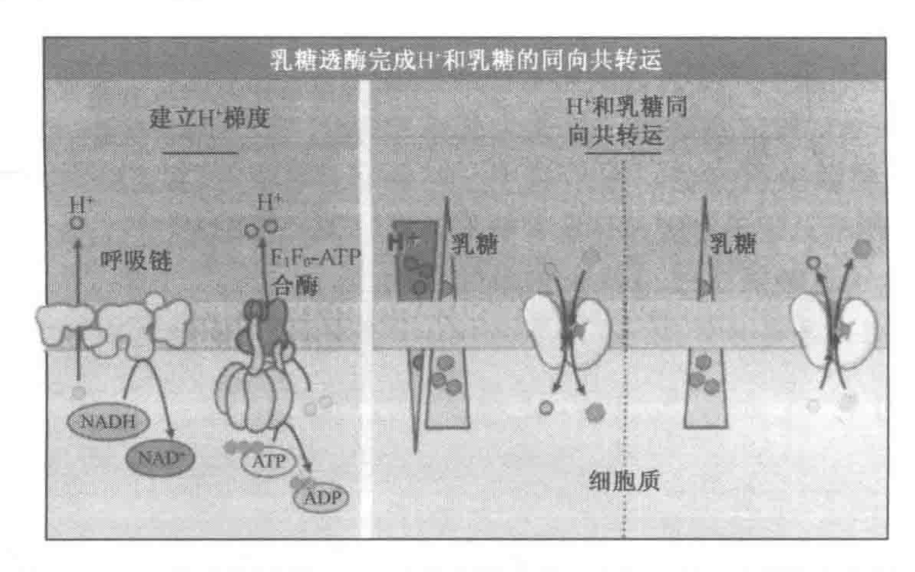


图 2.37 细菌乳糖透酶 LacY 催化乳糖吸收，由向内的 H^+ 梯度产生的能量驱动，H^+ 梯度是由细菌呼吸或 ATP 水解建立的，ATP 水解从细胞中运出质子。或者，LacY 也能利用乳糖梯度的能量驱动质子的向上移位，转出细胞。

LacY 有 12 个跨膜螺旋，这些螺旋由亲水环和胞质 N 端和 C 端连接，如图 2.38 所示。LacY 每 6 个跨膜螺旋成一个结构域，共有两个结构域，形成一个对称的心形结构，这是由 X 射线晶体结构分析得到的，如图 2.39 所示。底物结合位点是一个亲水性的凹槽，大约在脂双层的中心。LacY 的晶体结构显示为一个向内的构型，有一个打开的凹槽，面向细胞质。

以前提出的乳糖/质子转运机制的 LacY 变构模型与晶体结构一致。在图 2.39 展示的这个交替进入模型（alternating access model）中，LacY 的底物结合位点既可以由细胞内侧又可以由细胞外侧进入，但不是两侧同时进入。质子和乳糖结合到 LacY 的向外构象诱导一种构象变化，变成向内构象。在构象改变之前两种底物都可以结合，这种结构上的安排，允许耦联和同时转运两种物质。乳糖和质子被释放进细胞，然后诱导构象暂时变回向外构象。以这种方式，底物结合和释放，降低了向内和向外构象之间的能量障碍，有利于它们之间相互转换。

细菌 3-磷酸甘油转运体 GlpT 是一个与 LacY 相关的反向转运体。GlpT 使 3-磷酸

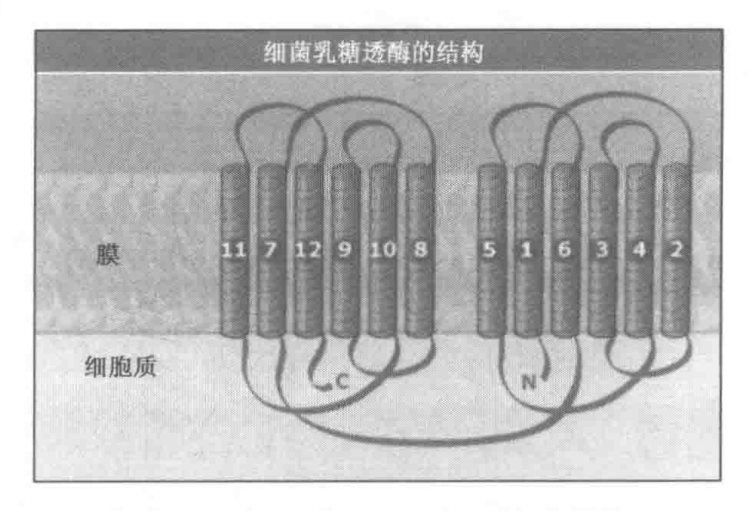


图 2.38　细菌乳糖透酶 LacY 的拓扑结构。

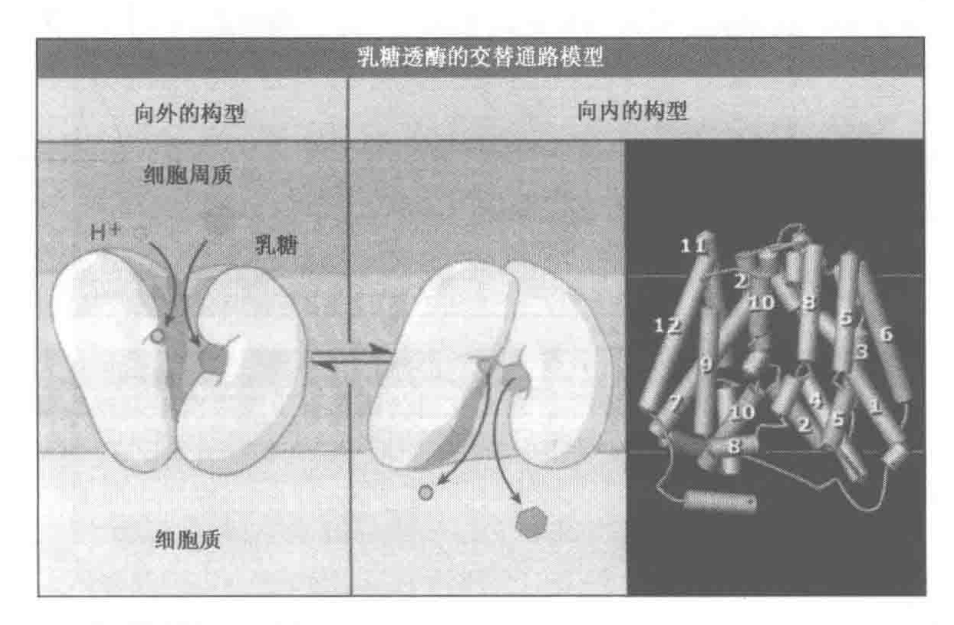


图 2.39　乳糖透酶 LacY 向内和向外构型（inward- and out-ward-facing configuration）之间的构象（coformation）改变模型。X 射线晶体结构图显示的是转运体的向内的构象，带有朝向细胞质打开的底物结合凹槽。晶体结构的图片来自于 Protein Data Bank file 1PV6。指明了膜的假定位置。

甘油进入细胞积聚，用于产生能量和合成磷脂。GlpT 是一个有机磷/无机磷（Pi）交换器，被 Pi 梯度驱动，如图 2.40 所示。与 LacY 相似，GlpT 有一个对称的 N 端和 C 端结构域，每一个结构域包括围绕着底物移位通路的六个跨膜区段。尽管 LacY 的功能是作为一个同向转运体，而 GlpT 是一个反向转运体，但两种转运体可能都采用基本的交替进入机制进行转运。尽管对于 GlpT，3-磷酸甘油结合及磷酸被释放是在向外构象发生的，而相反的活动则在向内构象进行。对于葡萄糖单向转运体也提出了交替进入机制（见 2.14 一些葡萄糖转运体是单向转运体）。

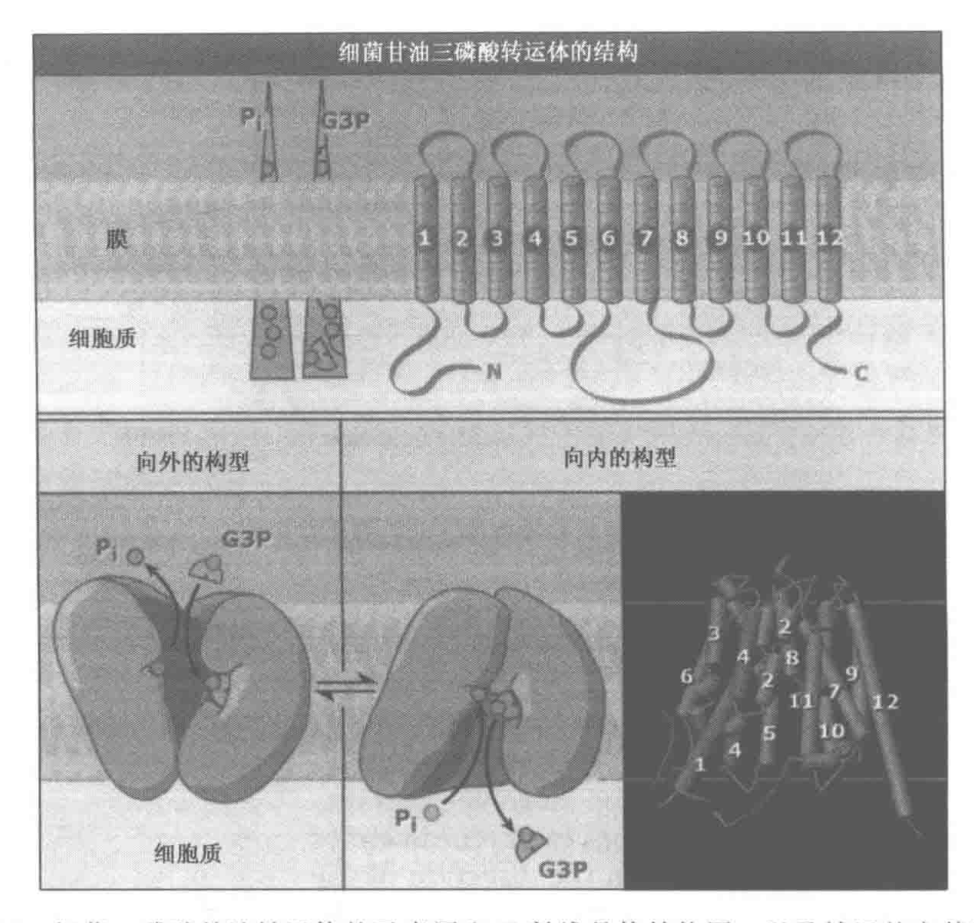


图 2.40 细菌 3-磷酸甘油转运体的示意图和 X 射线晶体结构图，以及转运的交替进入模型。这个转运体与乳糖透酶 LacY 相似。顶部左边的插图显示跨细菌细胞膜的磷酸根和 3-磷酸甘油梯度。晶体结构是具有向内构型的转运体；图片来自于 Protein Data Bank file 1PW4。指出了假定的膜的位置。

2.16 跨膜的 Na^+ 梯度对于很多转运体的功能是必需的

关键概念

- Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 梯度。
- Na^+ 顺着其电化学梯度移动所释放的能量与多种底物的转运耦联。
- 消化道通过 Na^+/葡萄糖转运体吸收糖。
- Na^+/Ca^{2+} 交换器是主要的转运机制，从可兴奋细胞的胞质溶胶中移去 Ca^{2+} 离子。
- $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体调节细胞内 Cl^- 浓度。
- Na^+/Mg^{2+} 交换器将 Mg^{2+} 转运出细胞。

细胞维持一个朝向内部的跨膜 Na^+ 梯度（见图 2.2），这对于许多 Na^+ 依赖的膜转运机制是先决条件。质膜的电化学 Na^+ 梯度是由 Na^+/K^+-ATPase 产生的，它是主要的主动转运蛋白。它把 ATP 水解释放的能量与把三个 Na^+ 转运出细胞，两个 K^+ 转运进细胞的这个过程耦联起来。这两种离子都是逆着它们的浓度梯度转运的。因为有净正电荷流出细胞，Na^+ 泵被认为是产电的。Na^+/K^+-ATPase 的活动帮助维持跨质膜的电荷差异，以至于细胞内比细胞外环境更具负电性。净电荷差异构成了负的静息膜电位。

换句话说，维持电化学 Na^+ 梯度所需的能量被储存在质膜中（膜电位的细节见 2.4 跨膜的电化学梯度产生膜电位；Na^+/K^+-ATPase 的细节见 2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜中的 Na^+ 和 K^+ 梯度）。

电化学 Na^+ 梯度对于维持许多组织的生理功能十分重要。许多 Na^+ 或电压依赖的通道和次级主动转运蛋白，利用被储存在朝向内部的电化学 Na^+ 梯度的能量驱动溶质逆着浓度梯度积聚，或者产生动作电位形式的电信号，图 2.15 列出了一些次级主动转运蛋白。两种主要的 Na^+ 依赖的膜蛋白包括电压依赖的 Na^+ 通道和上皮 Na^+ 通道（见 2.7 电压依赖的 Na^+ 通道被膜去极化激活并转换电信号和 2.8 上皮 Na^+ 通道调节 Na^+ 的内稳态）。第三种类型是 Na^+/底物转运蛋白，基于序列相似性，它们被分成不同的家族。在本节，我们将讨论一些这类转运蛋白。涉及 pH 调节的 Na^+ 依赖转运蛋白将在下一节讨论（见 2.17 一些 Na^+ 转运体调节细胞内或细胞外 pH）。

图 2.41 举例说明了一些 Na^+ 依赖的底物转运体。大部分 Na^+/底物转运体在进化上没有相关性，所以这些家族成员在底物或转运过程上是不同的。Na^+/底物转运体可能是分解代谢通路的一部分，为细胞的代谢活动提供底物。这些转运体利用 Na^+ 梯度驱动底物向上的转运，如离子、糖、氨基酸、维生素，以及尿素进出细胞。这些转运体中有 Na^+/葡萄糖共转运体和 Na^+/ 碘共转运体。在一些细菌中，Na^+/ 脯氨酸共转运体参与渗透压调节；在其他细菌中，Na^+/底物同向转运体在细菌感染它们的寄主期间，增加细菌的存活率。

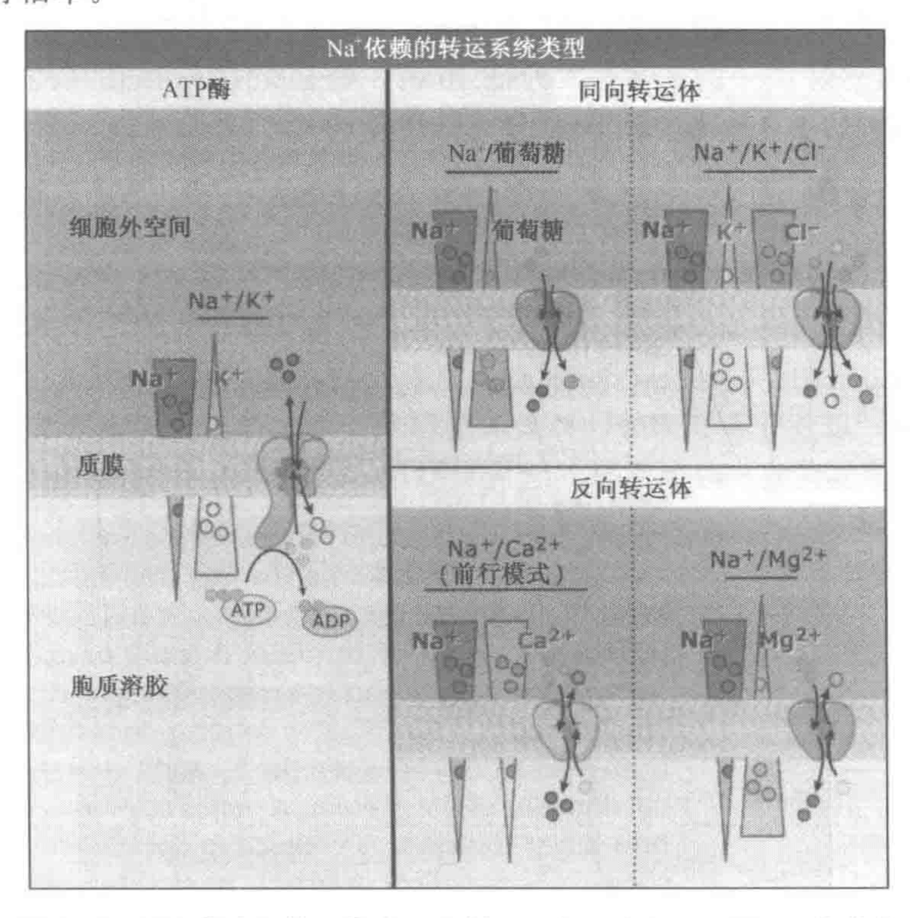


图 2.41　Na^+ 依赖的转运体的一些例子。由 Na^+/K^+-ATPase 维持的质膜 Na^+ 梯度的能量，被这些转运系统以及其他的转运系统利用。插图显示一个典型的动物细胞中的离子梯度。

一些细胞，像肠道的刷状缘（intestinal brush border）处的那些细胞，在吸收营养时，利用跨膜的 Na^+ 梯度驱动糖逆着它们的浓度梯度转运。Na^+/葡萄糖共转运体（见图 2.41）介导从肠腔中吸收膳食中的两种糖：D-葡萄糖和 D-半乳糖。这个共转运体是 *SGLT1* 基因家族的一个成员，该家族有一个含 13 个跨膜螺旋的共同的核心结构。Na^+/葡萄糖共转运体的糖结合和移位通路是由靠近 C 端的四个跨膜螺旋构成的。有人提出 Na^+/葡萄糖共转运体的 N 端区域负责 Na^+ 结合，Na^+/葡萄糖的共转运是该蛋白 N 端和 C 端的相互作用的结果。一个主要的问题是糖转运怎样与电化学 Na^+ 梯度耦联。一个流行的模型提出，一个细胞外 Na^+ 离子结合到转运体上一个空的结合位点，诱导一种构象变化，允许糖结合。糖结合将诱导一个次级构象变化，暴露 Na^+ 和糖使其朝向细胞膜的内侧。在 Na^+ 和糖释放进入细胞时，空的 Na^+/葡萄糖共转运体又将改变构象，回到其起始位置。总的说，这个模型所提出的构象变化与单向转运体 GLUT-1 的构象变化是相似的，GLUT-1 是一个葡萄糖转运体（见 2.14 一些葡萄糖转运体是单向转运体）。

许多细胞外信号诱导细胞内产生 Ca^{2+} 信号（见第 14 章细胞信号转导原理）。未受刺激的细胞维持一个低的胞质溶胶 Ca^{2+} 浓度，大约为 10^{-7} mol/L。Ca^{2+} 信号发生依赖于 Ca^{2+} 的激活，此时胞质 Ca^{2+} 浓度的增加是由于细胞外的 Ca^{2+} 内流和 Ca^{2+} 从肌质网 Ca^{2+} 库中释放。当信号终止时，Ca^{2+} 转出胞质溶胶，跨过细胞质膜进入肌质网。大多数动物细胞的质膜中，两种主要的 Ca^{2+} 外排蛋白（Ca^{2+} extrusion protein）是 Na^+/Ca^{2+} 交换器（NCX）（见图 2.41）和 ATP 驱动的 Ca^{2+} 泵。与质膜 Ca^{2+}-ATPase 相比，Na^+/Ca^{2+} 交换器对 Ca^{2+} 的亲和性大约低 10 倍，但是有 10～50 倍高的流通速率。因此，在可兴奋细胞中，Na^+/Ca^{2+} 交换器构成主要的 Ca^{2+} 外排系统，将 Ca^{2+} 排到质膜的细胞外侧（可兴奋细胞中 Ca^{2+} 信号传递的细节见 2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。

Na^+/Ca^{2+} 交换器形成一个蛋白家族。预计心肌的交换器有 9 个跨膜区段及一个大的细胞内环，内环对调节交换器十分重要，还有在离子移位过程中十分重要的反平行 α-重复域（antiparallel α- repeat domain），如图 2.42 所示。两个 α-重复区域包括跨膜区段 2 和 3 部分，以及 8 和 9 部分，并且取向相反，与水孔蛋白构成的水通道的结构类似。另外，α-重复区域有两个 P-环，含有甘氨酸-异亮氨酸-甘氨酸序列，使人回想起

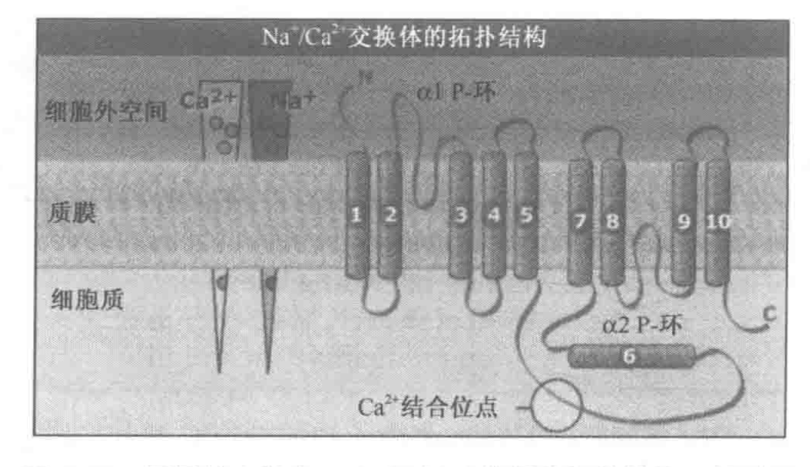


图 2.42　预测的心肌中 Na^+/Ca^{2+} 交换器的拓扑结构。插图显示一个静息细胞中的 Na^+、Ca^{2+} 梯度。

K^+通道的选择性过滤器的甘氨酸-酪氨酸-甘氨酸序列（水通道的细节见 2.11 通过水通道选择性转运水。K^+通道的选择性过滤器的细节见 2.5 K^+通道催化选择性和快速的离子渗透）。基于序列分析、突变以及功能试验，提出了 Na^+/Ca^{2+} 交换器的拓扑结构。这样，与葡萄糖转运体 GLUT-1 和 Na^+/葡萄糖共转运体模型相比，Na^+/Ca^{2+} 交换器被认为与通道蛋白相似。

Na^+/Ca^{2+} 交换器被认为转运三个 Na^+ 来交换一个 Ca^{2+}，每一次转运循环产生一个正电荷的净电流。交换器可以把 Ca^{2+} 转进或转出细胞，这取决于净电化学驱动力。例如，在静息状态的心肌细胞中，膜电位 Em 比平衡电位 Encx 值小，Ca^{2+} 被排出细胞。但是，在心脏动作电位处于阶段 0 和 1 的上升阶段，Em 超过 Encx，导致一个短时期的 Ca^{2+} 通过交换器进入细胞。膜的再次复极化进程使膜电位更负，Em 小于 Encx，Ca^{2+} 再次被排出细胞。这样，当与 Na^+/Ca^{2+} 交换器的逆转电位（reversal potential）有关系的膜电位变得更正时，由转换器介导的净 Ca^{2+} 运动短暂地改变方向，如图 2.43 所示。在相对长的心脏动作电位开始的期间，当跨膜的 Na^+ 或 Ca^{2+} 梯度改变时，发生超过几毫秒的生理性的 Ca^{2+} 内流。在生理条件下，由 Na^+ 梯度驱动，交换器主要以 Ca^{2+} 外排的模式工作。但是，在动作电位的平台期，正的膜电位会限制 Ca^{2+} 外排（心脏动作电位的细节见 2.12 动作电位是依赖几种类型离子通道的电信号和 2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。

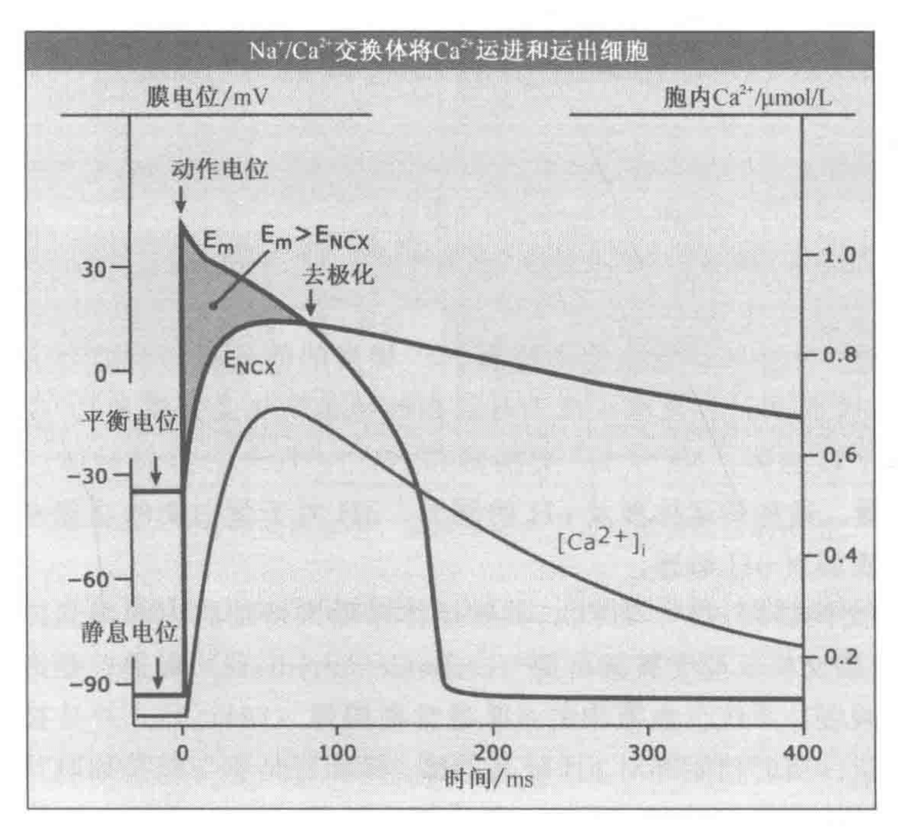


图 2.43 Na^+/Ca^{2+}-交换器（NCX）正向或反向运转模式取决于膜电势。

利用 Na^+ 梯度的能量驱动跨膜离子转运的另一种转运体是 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体，以 1 Na^+ ∶1K^+ ∶2Cl^- 的化学计量介导电中性的转运（见图 2.41）。在生理状态下，共转运体催化这些离子转运进细胞。共转运体维持细胞内 Cl^- 浓度；在特化的上皮细胞中，共转运体积聚细胞内 Cl^-，其浓度在电化学平衡之上。例如，在肾脏的

Henle's 襻粗升支中，$Na^+/K^+/Cl^-$共转运体在面向管腔的特殊上皮细胞的顶膜上存在。共转运体对于从肾脏滤液中重吸收 NaCl 非常重要，如图 2.26 所示。

编码肾脏 $Na^+/K^+/Cl^-$共转运体异构体基因的突变导致正常染色体隐性失调（autosomal recessive disorder），被称为 Bartter's 综合征。患有 Bartter's 综合征的病人损失尿液中的水和盐，降低了尿液的浓缩能力，增加了尿液中的 Ca^{2+}外排。一个转运蛋白异构体的变异的这些效应显示，跨细胞离子转运是由很多类型的转运蛋白协作来介导的，并且一个蛋白的功能失调可能会影响其他几个蛋白的功能。实际上，其他的与 $Na^+/K^+/Cl^-$共转运体协同工作的转运蛋白介导肾脏中盐的吸收，这些转运蛋白的突变也会导致 Bartter's 综合征。这些突变包括 K^+通道和 Cl^-通道（CLC-K），Cl^-通道（CLC-K）是基底外侧氯离子传导的一个组分。

Na^+/Mg^{2+}交换器是又一个 Na^+依赖的，次级转运蛋白的例子（见图 2.41）。因为高浓度的 Mg^{2+}干扰很多细胞功能，细胞内的 Mg^{2+}受到一个缓冲机制的严格控制。例如，在一系列蛋白中，Mg^{2+}在 Ca^{2+}/Mg^{2+}激活/失活联合位点与 Ca^{2+}竞争。因为 Mg^{2+}仅以很低的浓度透过质膜，它必须不断地从细胞质排出以维持生理浓度。主要的排出机制是 Na^+/Mg^{2+}交换器。有人提出 Na^+/Mg^{2+}交换器在生理条件下是电中性的，把两个 Na^+转进细胞的同时把一个 Mg^{2+}排出细胞。Na^+/Mg^{2+}交换器也是一个重要的药物靶点，广泛地被抗抑郁症药物采用。

2.17 一些 Na^+转运体调节细胞内或细胞外 pH

关键概念

- Na^+/H^+交换器控制细胞内的酸和细胞体积自稳。
- Na^+/HCO_3^- 共转运体的净作用是通过直接转运 HCO_3^- 除去酸。

在前面说过，很多转运蛋白使用跨膜 Na^+梯度的能量驱动其他离子和溶质跨质膜移动（见 *2.16 跨膜 Na^+梯度对于很多转运体的功能来说是必需的*）。在本节，我们将讨论另外的两个转运体，Na^+/H^+交换器和 Na^+/HCO_3^- 共转运体，它们需要跨膜 Na^+梯度的能量。这些转运体涉及 pH 的调节，pH 对于蛋白质的功能来说是十分重要的，很多蛋白质都对 pH 敏感。

Na^+/H^+交换器和 Na^+/HCO_3^- 共转运体帮助维持细胞内和细胞外酸碱平衡。碳酸氢盐/二氧化碳交换反应受碳酸酐酶（carbonic anhydrase）促进，是细胞外液，如血浆中最重要的酸缓冲系统。血液中的 pH 通常稍偏碱（pH7.4），并且被严格调控，因为很多细胞和蛋白质的功能都对 pH 极其敏感。肺和肾是参与维持细胞质的酸碱平衡的器官，分别通过排泄挥发性酸（CO_2）和非挥发性酸（nonvolatile acid）来进行平衡。肾脏帮助控制血液的 pH 是通过调节沿着近端小管最初区段（early segment of proximal tubule）排列的上皮细胞中的 HCO_3^- 转运，如图 2.44 所示。在这些细胞中 CO_2有两个来源：跨细胞膜的扩散和被特殊酶催化合成。在近端小管中的碳酸酐酶催化由 HCO_3^-和 H^+合成 H_2O 和 CO_2。CO_2 可以自由扩散进入近端小管的上皮细胞，在那里 H_2O 和 CO_2 又被碳酸酐酶催化合成 HCO_3^- 和 H^+。这样，经由顶膜的 Na^+/H^+ 交换器

(NHE)，质子（酸）被分泌进腔过滤液，与等量的碳酸氢碱等价物（bicarbonate base equivalent）的转运耦联，碳酸氢碱经由近端小管基底外侧膜上的 Na^+ / HCO_3^- 共转运体进入血液。从细胞中耦联分泌的 H^+ 和 HCO_3^-，是电中性的，对于分泌非挥发性酸等价物进入尿液（贡献于代谢酸的内稳态）来说是一种重要的机制。净效应就是从血浆滤液中以 CO_2 的形式重吸收碳酸氢盐，然后作为 HCO_3^- 跨顶膜转运进血浆。同时，NHE 通过近端小管初段从血浆滤液中大量重吸收 Na^+；Na^+ 然后被转运回血浆。近端小管酸调节及重吸收的一个关键要素是基底外侧膜上的 Na^+ / K^+-ATPase。总地来说，H^+ 外排和 Na^+ 跨顶膜进入细胞是由特殊的同向和反向转运蛋白介导的。

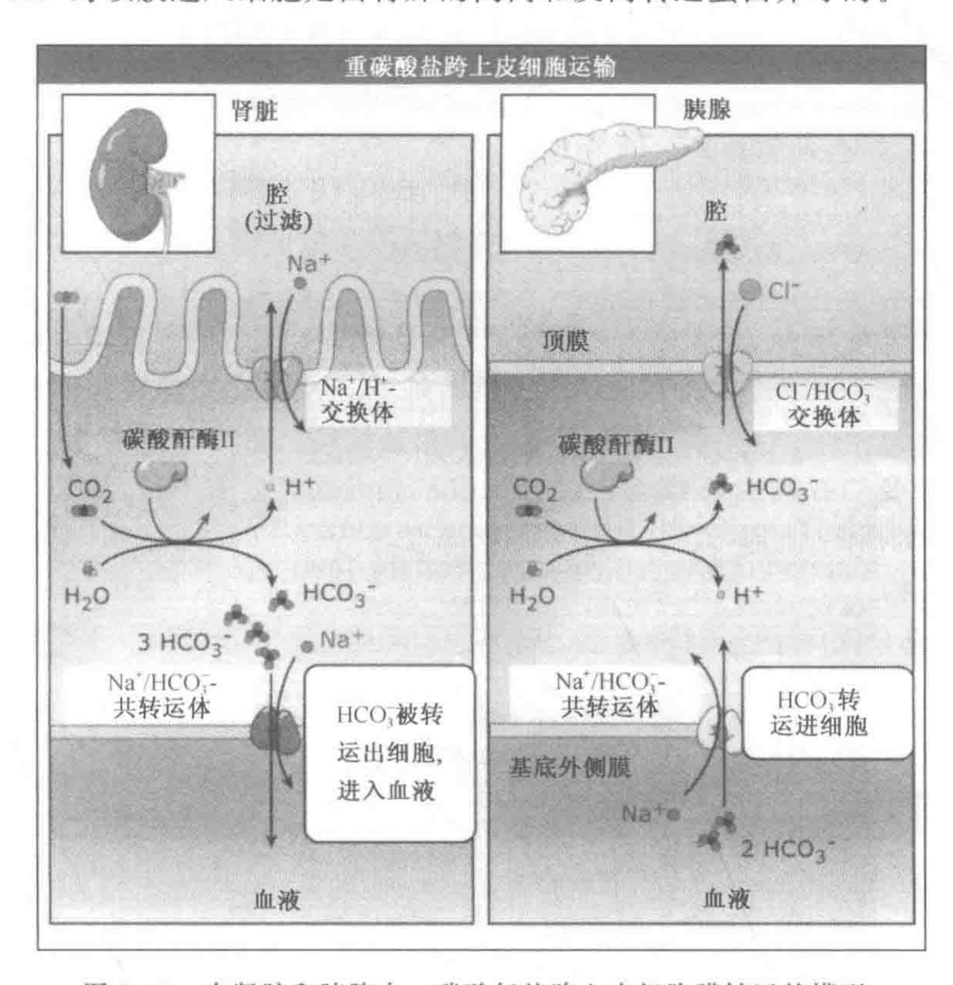


图 2.44　在肾脏和胰腺中，碳酸氢盐跨上皮细胞膜转运的模型。

与肾脏相比，在胰腺或其他的分泌器官中，上皮细胞是跨顶膜分泌碳酸氢盐。在分泌器官中，向内的 Na^+ 梯度驱动 HCO_3^- 以 1 个 Na^+ 对 1 个或更多 HCO_3^- 的化学计量方式共转运进细胞中（见图 2.44）。在胰腺中，基底外侧膜上的 Na^+/HCO_3^- 共转运体介导从血浆中吸收碳酸氢盐，碳酸酐酶催化产生 HCO_3^-，碳酸氢盐通过顶膜上的一个 Cl^-/HCO_3^- 交换器被转运进消化道。胰腺和十二指肠的分泌在缓冲来自胃的酸（胃酸）以及重要的消化酶激活方面发挥了重要作用。肾脏和胰腺表达不同的 Na^+/HCO_3^- 共转运体异构体。图 2.45 展示了由序列分析得出的这些共转运体的拓扑结构。

Na^+/H^+ 交换器是质膜和胞内细胞器上的膜内在蛋白（integral membrane protein)。除了调节细胞内 pH 外，它还在细胞体积调节、电解质的系统控制、酸代谢，以及液体体积内稳态方面发挥着重要作用。Na^+/H^+ 交换器催化 Na^+ 和 H^+ 顺着它们各自

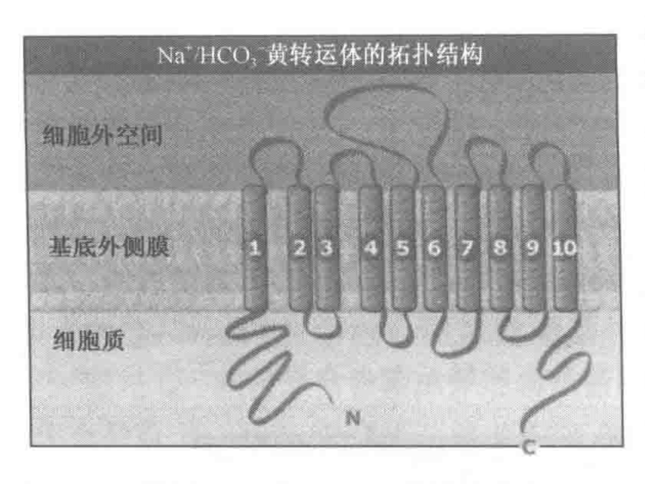


图 2.45　预测的 Na^+/HCO_3^- 共转运体膜拓扑结构。插图表示的是肾脏和胰腺中，跨上皮细胞基底外侧膜的 Na^+ 和 HCO_3^- 的梯度。

的浓度梯度的电中性转运。Na^+/H^+ 交换器是次级主动转运体。由质膜 Na^+/K^+-ATPase 建立的向内的 Na^+ 梯度以 1 Na^+/1 H^+ 的化学计量方式驱动质子的反向转运（counter-transport）。跨膜的 Na^+ 内流作用于细胞体积的调节，以及跨上皮细胞的盐和水的吸收。在对细胞内 pH 的变化，各种细胞外刺激如生长因子和激素、机械刺激如渗透压和细胞扩展等作应答时，Na^+/H^+ 交换器受到调控。在生理条件下，质膜 Na^+/H^+ 交换器改变活性，排出由细胞内代谢和 H^+/酸渗漏通路（leak pathway）积聚的过量的酸。和碳酸氢盐转运系统一起，Na^+/H^+ 交换器在维持细胞内酸碱平衡方面发挥了关键作用。

Na^+/H^+ 交换器异构体 1（NHE1）被认为是质膜上典型的哺乳类交换器；其他异构体在组织表达和膜定位方面有所不同。所有的 Na^+/H^+ 交换器异构体都有共同的结构。次级结构的计算机模型预示了一个共同的拓扑结构，在其 N 端有 12 个保守的跨膜区段和更加可变的细胞内 C 端，它包含很多磷酸化位点，可结合调节蛋白和中介体（mediator），如图 2.46 所示。N 端的跨膜区域被认为包含对 Na^+/H^+ 交换有重要作用的催化核心结构。在跨膜区段 9 和 10 之间的一个大的细胞外重进入凹环（extracellular re-entrant loop，R-loop）与 K^+ 通道上验明的孔环相似，可以形成离子传导通路的一部分。两个 Na^+/H^+ 交换器蛋白可以形成一个同源二聚体结构。

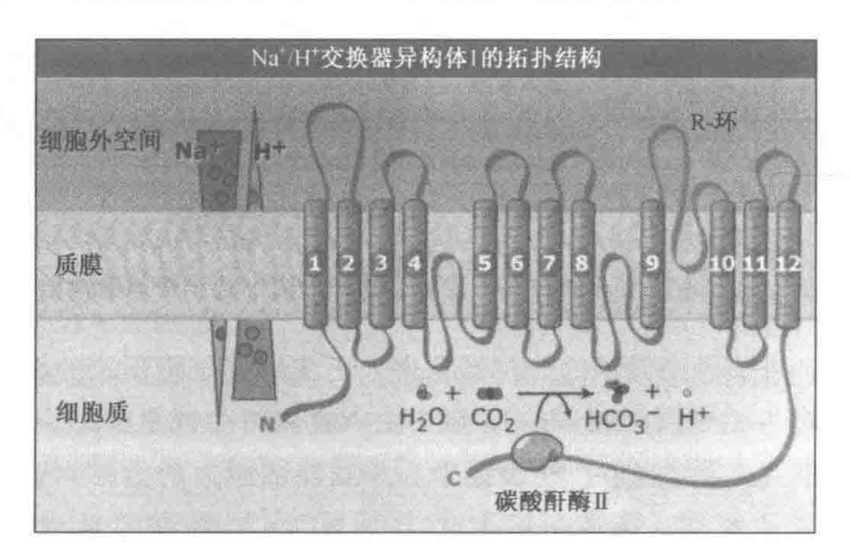


图 2.46　预测的 Na^+/H^+ 交换器异构体 1（NHE1）的膜拓扑结构。NHE1 的功能以几种不同的方式被调节。图中展示的是碳酸酐酶Ⅱ的结合受到调节，碳酸酐酶Ⅱ可以刺激 NHE1 的转运活性。左边的插图指明动物细胞中跨质膜的 Na^+ 和 H^+ 梯度。

细菌有 Na^+/H^+ 交换蛋白，它利用跨膜电化学 H^+ 梯度的能量来将 Na^+ 排出细胞，同时交换 H^+ 流入细胞。在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中，主要的 Na^+/H^+ 交换器是

NhaA，它调节细胞的 Na^+ 含量和 pH，对在高盐和（或）碱性条件下细胞的生存尤其重要。NhaA 在细胞质膜中以二聚体存在；每一个单体有 12 个跨膜区段。图 2.47 展示了在酸性 pH 环境下得到的失活构象的 NhaA 单体的 X 射线晶体结构。在膜的两侧，蛋白有漏斗形表面，带负电荷的氨基酸沿着它排列，吸引阳离子。在膜的中心，氨基酸 Asp163 和 Asp164 形成 Na^+ 结合位点。在酸性 pH 下，只有 Asp164 暴露在渗透通路中，细胞质路径则被螺旋 XIp 阻挡。

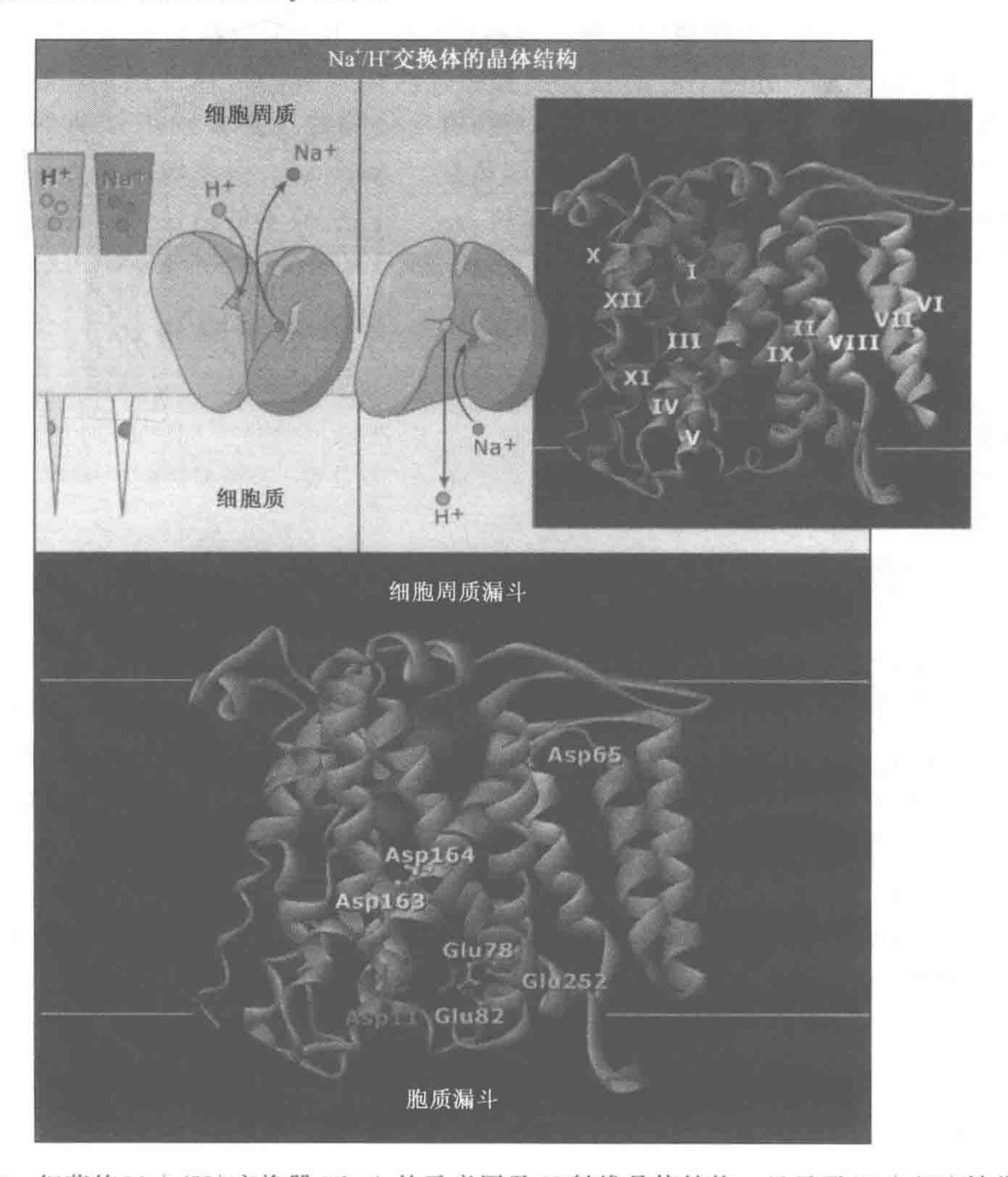


图 2.47 细菌的 Na^+/H^+ 交换器 NhaA 的示意图及 X 射线晶体结构，显示了 Na^+/H^+ 转位以及 pH 调节的结构基础。此晶体结构以蛋白主链的带状图（ribbon diagram）描述。残基与侧链一起展示，残基的改变会影响 pH 调节以及阳离子转运。示意图显示的是转位的交替进入模型（alternating access model），是由分析结构特征得出的。插图显示了跨膜的 Na^+ 和 H^+ 梯度。原子结构图来自于 Protein Data Bank file 1ZCD。

有人提出，NhaA 利用交替进入（alternating access）机制转运 Na^+ 和 H^+（见 2.15 同向转运体和反向转运体介导耦联转运）。这个模型提出，细胞质侧碱性 pH 的变化诱导螺旋Ⅸ构象变化，它反过来又引起螺旋Ⅺp 和Ⅳc 的重新定向，由此暴露 Na^+ 结

合位点，并移除细胞质障碍。Na^+结合到细胞质侧的位点将触发靠近细胞质侧的螺旋Ⅺp和Ⅳc发生一个额外的，小的构象变化，使Na^+暴露于胞质。随着Na^+释放进细胞周质侧（periplasmic side）（细胞外侧），Asp163和Asp164将被质子化，这会诱导构象改变，从而将Na^+结合位点暴露于胞质，在胞质中天冬氨酸残基将被去质子化。

人类细胞中Na^+/H^+交换器活性的改变与几种疾病的发生有关，这些疾病包括高血压（hypertension）、腹泻（diarrhea）、糖尿病（diabetes）和由心肌缺血（ischemia）（梗阻或血流慢）引起的组织损伤。在心脏和神经组织中，心肌缺血导致Na^+/H^+交换器活性增加。这引起细胞内Na^+浓度增加和次级的细胞内Ca^{2+}浓度增加，这是由于在反向模式（reverse mode）中Na^+/Ca^{2+}交换器活化所致（见2.16跨膜的Na^+梯度对于很多转运体的功能是必需的）。Ca^{2+}的过负载（overload）引发级联事件，导致心律失常或中风之后的神经组织损伤。药物抑制Na^+/H^+交换器的活性可能在心肌缺血之中或之后有好的作用，作为一种治疗手段正在被积极地研究。

2.18 Ca^{2+}-ATPase把Ca^{2+}泵进细胞内的储存隔室中

关键概念

- Ca^{2+}-ATPase经过一个反应循环（reaction cycle），涉及两个主要的构象，与Na^+/K^+-ATPase相似。
- Ca^{2+}-ATPase亚基的磷酸化驱动构象变化以及Ca^{2+}跨膜转移。

激素或电信号在质膜上对细胞的刺激被转化为胞质内的Ca^{2+}浓度瞬时增加，随后会调节广泛的细胞内应答。Ca^{2+}激活特定的细胞内反应，从基因转录和蛋白质合成到调节激素分泌、免疫活化、细胞运动、神经兴奋和细胞收缩。几乎所有的细胞都依赖于细胞内Ca^{2+}库释放Ca^{2+}来迅速增加胞质内Ca^{2+}的浓度（见2.13兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。胞质内Ca^{2+}浓度的增加依赖于从内质网（ER）中释放Ca^{2+}。内质网除了在分泌途径中发挥作用（见第3章蛋白的膜定位和第4章蛋白质在膜之间的运输），还作为细胞内Ca^{2+}的储藏隔室。内质网中Ca^{2+}浓度维持在大约10^{-3}mol/L，胞质溶胶内的Ca^{2+}浓度约为10^{-7}mol/L，这样从内质网朝向胞质溶胶产生一个很陡的电化学浓度梯度。在Ca^{2+}信号反应发生过后，又重新建立静息的Ca^{2+}浓度。参与Ca^{2+}从胞质溶胶外排的主要的Ca^{2+}转运蛋白是Ca^{2+}-ATPase，在内质网和质膜上存在着不同的Ca^{2+}-ATPase异构体（isoform）。

在本节，我们将会讨论在骨骼肌细胞和神经元中主要的Ca^{2+}-ATPase之一。骨骼肌细胞中有一个大的细胞内Ca^{2+}库（Ca^{2+} store）特殊结构，叫做肌质网（sarcoendoplasmic reticulum，SR），肌质网有效地控制遍及整个细胞的Ca^{2+}的吸收和释放。在这些细胞中肌质网Ca^{2+}-ATPase（SERCA）负责肌肉细胞中大部分Ca^{2+}从细胞内外排。肌肉细胞是身体内最大的细胞之一，为了遍及细胞的收缩蛋白可以有效地活化和松弛，细胞内的Ca^{2+}释放网络和重吸收位点是必需的（细节见2.13兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌和第8章微丝）。

SERCA泵是一个受Ca^{2+}激活的ATPase，是ATP依赖泵（ATP- dependent pump）大家族的一部分，被称为P型ATPase。P型ATPases利用一种结构机制使

ATP 水解释放的能量耦联 H^+、Na^+ 或 Ca^{2+} 的向上转运（uphill transport）。P 型 ATPase 的一个标志是在合适的阳离子存在的情况下，P 型 ATPase 利用 ATP 去自磷酸化（autophosphorylate）一个保守的天冬氨酸残基。经 ATP 磷酸化的结果是产生一个高能磷酸蛋白中间体（intermediate），在泵的反应循环（reaction cycle）中驱动 Ca^{2+} 结合和磷酸转移这两个交替步骤。用这种方法，SERCA 泵利用 ATP 水解释放的化学能把 Ca^{2+} 重吸收进肌质网的 Ca^{2+} 库，迅速降低细胞内 Ca^{2+} 浓度。

图 2.48 显示了设想的 SERCA 泵反应循环。在这个循环中有两个基本的构象：

- E_1 构象，以很高的亲和性在胞质溶胶一侧结合 Ca^{2+}，
- E_2 构象，以非常低的亲和性结合 Ca^{2+}，因而把 Ca^{2+} 从 Ca^{2+} 结合位点释放进肌质网腔中。

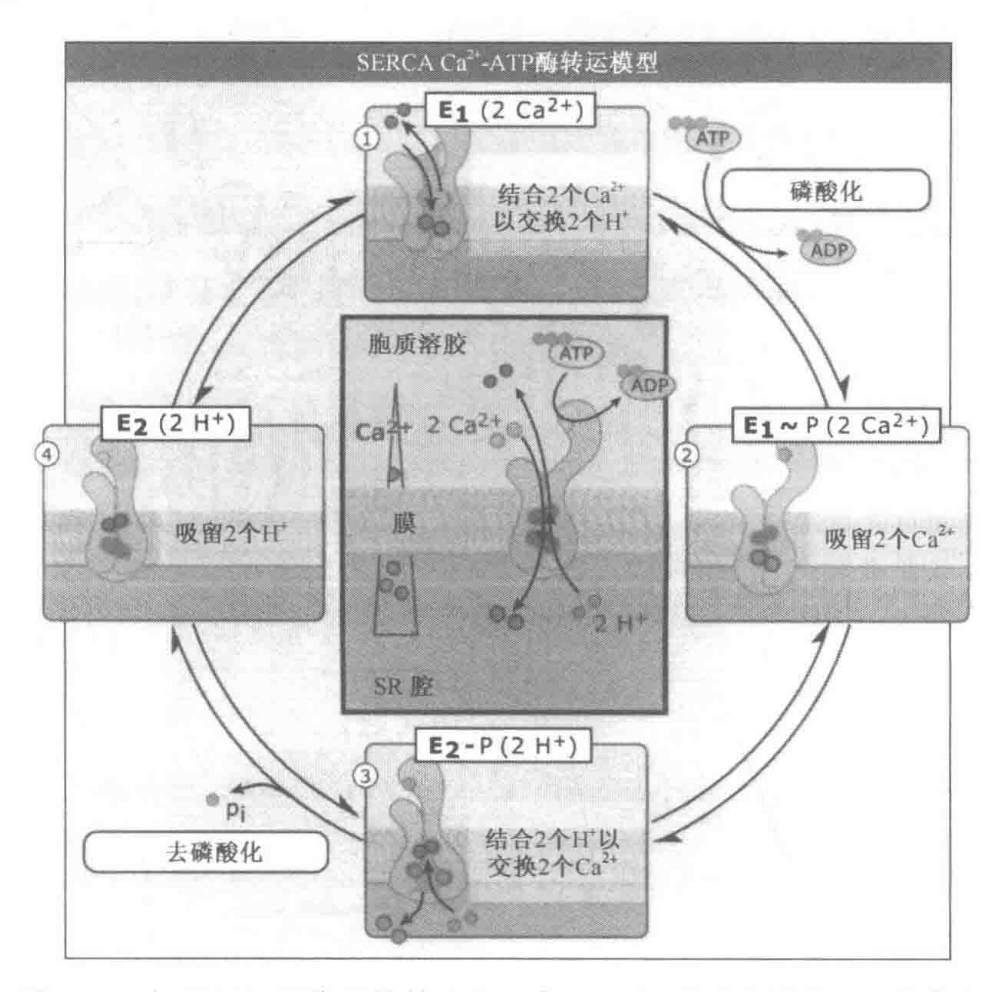


图 2.48 由 SERCA 泵将 Ca^{2+} 转运进肌质网（SR）的反应循环。E_1 构象以高亲和性结合 Ca^{2+}，而 E_2 构象则以低亲和性结合 Ca^{2+}。$E_1 \sim P$ 表示高能磷酸键。

在每一个酶循环（enzymatic cycle）期间，两个 Ca^{2+} 被转运进肌质网腔，据认为，质子按相反的方向被转运。来自胞质溶胶的两个 Ca^{2+} 的高亲和性结合诱导酶改变成 $E_1(2Ca^{2+})$ 构象。在这个构象中，蛋白经历了自磷酸化，形成高能 $E_1 \sim P(2Ca^{2+})$ 反应中间体。这个磷酸蛋白中间体的能量推动构象改变成 E_2- $P(2H^+)$ 构象，对 Ca^{2+} 有低亲和性。在这个构象中，来自细胞液的离子门被关闭，Ca^{2+} 转运位点的亲和性降低，朝向肌质网腔的离子门被打开。Ca^{2+} 被释放进肌质网的 Ca^{2+} 库，取而代之的是 H^+ 结合。

然后磷酸基团被水解，完成这个循环。总之，SERCA泵的反应循环由一系列的磷酸化和去磷酸化事件组成，它们推动每水解一个ATP，就把两个Ca^{2+}向上转运（uphill transport）到肌质网，换成结合两个H^+。

SERCA泵有一个不对称排列的跨膜区域和细胞液区域（cytosolic domain），在Ca^{2+}转运过程中经历了较大范围的运动。如图2.49所示，它包括10个跨膜的α螺旋（M1～M10），在跨膜螺旋之间，有两个大的细胞质环，一个环在M2和M3之间，另一个在M4和M5之间。跨膜的α螺旋形成Ca^{2+}结合位点，Ca^{2+}结合位点在E_1构象时，共同结合来自于细胞液的两个Ca^{2+}。两个细胞质环形成三个分开的区域。在螺旋M4和M5之间的环形成核苷酸结合（N）区域，它结合ATP和P区域，它包含催化磷酸化的位点。在M2和M3之间的环形成传动（A）区域（actuator domain），对于在细胞液区域和跨膜区域之间构象变化的传递十分重要。

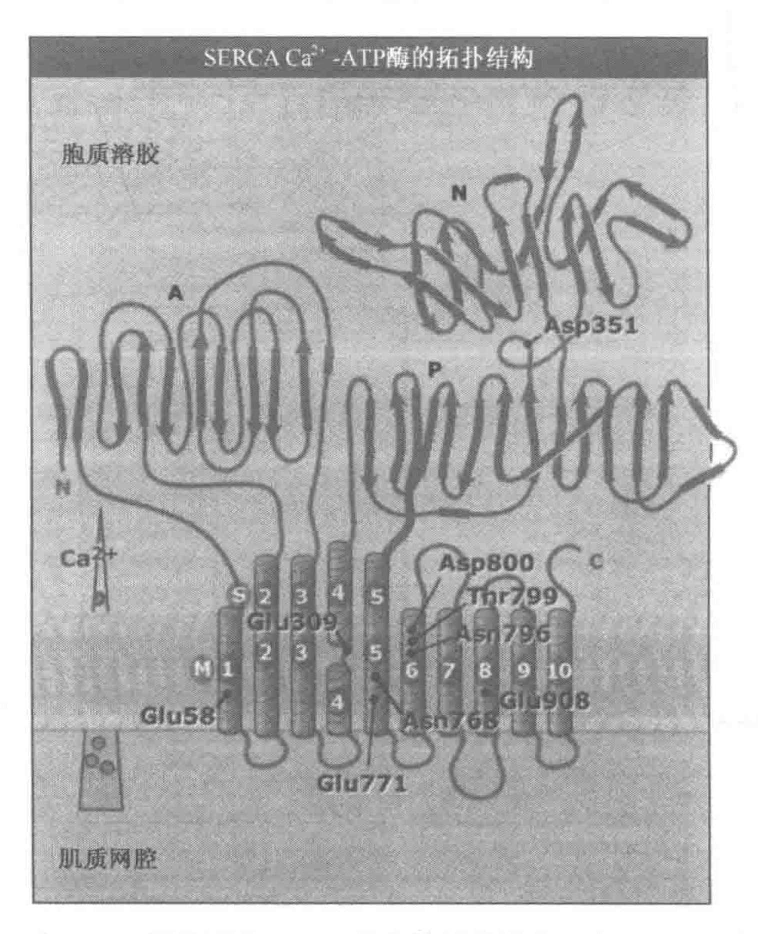


图2.49　阐明了SERCA1异构体的磷酸化位点（Asp351）的定位，以及参与Ca^{2+}结合的关键残基。插图指出了跨肌质网膜的Ca^{2+}梯度。

图2.50（见图版）展示了代表SERCA泵$E_2(2H^+)$和$E_1(2Ca^{2+})$构象的X射线晶体结构。跨膜区段包含形成Ca^{2+}渗透通路的疏水残基（见图2.50中来自于腔的视图）。通路的打开和关闭显然是分别通过M4和M5跨膜区段的延伸部分S4和S5与胞质区域的构象重排耦联的（见图2.49）。高亲和性Ca^{2+}结合结构在各胞质区域之间有一个大的缺口（gap），允许ATP结合到N区域。据认为在Ca^{2+}结合到跨膜区域形成$E_1(2Ca^{2+})$构象后，ATP结合允许P区域的一个关键的天冬氨酸残基Asp351磷酸化。这个磷酸



图 2.50 E_2 结构没有 Ca^{2+}，而 E_1 结构有两个 Ca^{2+} 结合。用一系列颜色描绘跨膜螺旋，从 M1 的红色到 M10 的深蓝。SERCA E_2 和 E_1 的 X 射线晶体结构图分别来自于 Protein Data Bank file 1EUL 和 1IWO。指出了膜的假定位置。

化最终导致构象改变为低亲和性的 E_2 构象，在这种构象中，跨膜区域的重排列破坏 Ca^{2+} 结合位点，打开 SERCA 泵腔侧（lumenal side）的门，释放 Ca^{2+} 到肌质网的腔中。在从 $E_2(2H^+)$ 构象转回 $E_1(2Ca^{2+})$ 构象期间，细胞液区域经历了大的运动，从一个紧密的结构变为开放的结构。这个开放的结构允许水进入，并且催化去磷酸化，这对 SERCA 泵转回到 Ca^{2+} 结合构象是十分重要的。Ca^{2+} 结合位点对于细胞液中的 Ca^{2+} 来说是可进入的，但是肌质网腔（lumenal）中的 Ca^{2+} 不能进入，这是由于在循环中 Ca^{2+} 结合的亲和性改变。

因为要停止肌肉收缩和引发松弛需要降低细胞内的 Ca^{2+} 浓度，通过 SERCA 的 Ca^{2+} 流只能从细胞液进入肌质网 Ca^{2+} 库，而不能反过来。通过 Ca^{2+}-ATPase 的离子流方向可以由顺序的 ATP 水解耦联矢量的 Ca^{2+} 转运来支配。在 ATP 结合和磷酸化的过程中，A、N、P 区域的构象改变拉动跨膜螺旋，关闭 Ca^{2+} 的细胞质入口，并且磷酰基转移（phosphoryl transfer）锁定这个门。因此在生理状态下，没有 Ca^{2+} 从肌质网倒流进细胞液。

SERCA 泵与质膜上的 Ca^{2+}-ATPase（PMCA）共同工作，把来自于细胞液的 Ca^{2+} 运走，并设定静息状态细胞液 Ca^{2+} 浓度的水平。这两种酶都有高的 Ca^{2+} 亲和性，高于

其他的 Ca^{2+} 结合蛋白或细胞液的缓冲液。PMCA 和 SERCA 泵有相似的结构和作用机制，有 10 个跨膜序列和三个大的细胞液区域。除了有不同的细胞定位外，PMCA 泵不同于 SERCA 泵的地方是，每水解一个 ATP 转运一个 Ca^{2+} 而不是两个。在可兴奋细胞中，肌质网 Ca^{2+} 库的膜上 SERCA 泵有更高的转运效率和更高的密度，解释了其将 Ca^{2+} 从细胞液中排走的数量上的压倒之势。

Na^+/K^+-ATPase 和 H^+-ATPase 同属于 ATPase 的 P 型家族，与 SERCA 泵有共同的结构特征（见 2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度 和 2.21 H^+-ATPase 把质子转运出细胞质）。Na^+/K^+-ATPase 和 Ca^{2+}-ATPase 之间的同源性比与其他 ATPase 的多，并且它们结构特征之间的比较支持了这样一个概念，即它们用相同的结构机制将 ATP 水解和阳离子跨膜转运耦联起来。所有这三种阳离子泵使用一种相似的催化循环，这个循环涉及 ATP 结合，导致被转运的阳离子被吸留（occlusion）的构象重排，阳离子在膜另一侧释放，以及去磷酸化，使酶回到原来离子结合的构象。

2.19 Na^+/K^+-ATPase 维持质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度

关键概念

- Na^+/K^+-ATPase 是 P-型 ATPase，与 Ca^{2+}-ATPase 和 H^+-ATPase 相似。
- Na^+/K^+-ATPase 维持跨质膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度。
- 质膜的 Na^+/K^+-ATPase 是产电的：它每转运两个 K^+ 进细胞，就转运三个 Na^+ 出细胞。
- Post-Albers 系统（scheme）描述了 Na^+/K^+-ATPase 的反应循环，它提出了在两个基本构象之间的酶循环。

所有的细胞与细胞外环境相比都是电负性的。这个电荷差异是因为在细胞外液中带正电荷的分子比带负电荷的分子稍多一些，而在细胞液中情况相反。跨质膜的电化学梯度对于细胞功能是基础；这与电池相似，电池维持电荷隔离，能被用于行使功能。在哺乳动物细胞中，Na^+、K^+ 梯度是跨质膜的电化学梯度中两个主要的成分。与细胞外环境相比，细胞维持一个较低的细胞内 Na^+ 浓度和一个较高的细胞内 K^+ 浓度。动物细胞中，Na^+、K^+ 电化学梯度的产生和维持需要 Na^+/K^+-ATPase 的活性，Na^+/K^+-ATPase 是一个离子泵，把 ATP 水解和阳离子转运耦联。Na^+/K^+-ATPase 帮助设定负的静息膜电位，来调节渗透压，避免细胞裂解或抽缩，并允许次级的 Na^+ 依赖的分子转运（见 2.7 电压依赖的 Na^+ 通道被膜去极化激活并转换电信号；2.8 上皮 Na^+ 通道调节 Na^+ 的内稳态；2.16 跨膜的 Na^+ 梯度对于很多转运体的功能是必需的；2.17 一些 Na^+ 转运体调节细胞内或细胞外 pH）。

Na^+/K^+-ATPase 属于 P 型 ATPase 家族，P 型 ATPase 家族也包括肌质网 Ca^{2+}-ATPase，这在前面已经讨论过了（见 2.18 Ca^{2+}-ATPase 把 Ca^{2+} 泵进细胞内的储存隔室）。P 型 ATPase 是一种酶，在离子转运过程中，它的天冬氨酸残基经自磷酸化形成一个磷酸化的反应中间体。在自磷酸化的过程中，P 型 ATPase 把 ATP 上的 γ-磷酸基团转移到酶的活性位点。每由 Na^+/K^+-ATPase 水解一个 ATP 分子，就有细胞液中的三个 Na^+ 和细胞外液中的两个 K^+ 发生交换。Na^+/K^+-ATPase 以每秒 100 次的速率循环运作。这个转运速率与穿过通道孔的离子流相比非常慢，离子流可以达到每秒通过

$10^7 \sim 10^8$个离子· 接近于水中离子扩散的速率。

Na^+/K^+-ATPase 的酶联离子转运循环的主要步骤已经由生物化学方法确定，图 2.51 展示的 post-Albers 反应图对此作了总结。关于 Na^+/K^+-ATPase 最早提出的是 post-Albers 模式，并且对确定所有 P 型 ATPase 的特殊状态有帮助。在这个模型中，P 型 ATPase 用两个不同的构型，叫做酶 1（E_1）和酶 2（E_2），来结合、吸留（occlusion）和转运离子。这些构象改变是由磷酸化-去磷酸化反应驱动的：

• 在 E_1 构象中，细胞内的 ATP 和 Na^+ 以高亲和性结合到 ATPase 上，形成 E_1ATP（3 Na^+）的状态，该状态立刻诱导在一个天冬氨酸残基上发生 ATP-磷酸化（ATP-phosphorylation），并且在 $E_1 \sim P$（3Na^+）状态下吸留三个 Na^+。

• 随后的构象改变到 $E_2 \sim P$ 状态，导致 Na^+ 亲和性降低，Na^+ 释放到细胞外空间，以及 K^+ 亲和性增加。

• 细胞外 K^+ 结合到 ATPase 上诱导 $E_2 \sim P$（2 K^+）去磷酸化和在 E_2（2 K^+）状态吸留两个 K^+。

• ATP 的细胞内结合诱导一种构象的转换，随后 K^+ 脱下（dissociation），形成 E_1ATP 状态。细胞内的 Na^+ 结合导致 E_1ATP（3Na^+）的形成。

序列分析和结构比对提示所有的 P 型 ATPase 有相似的蛋白质折叠和转运机制。Na^+/K^+-ATPase 包括两个主要的亚基，一个 α 催化亚基，在所有的 P 型 ATPase 中都

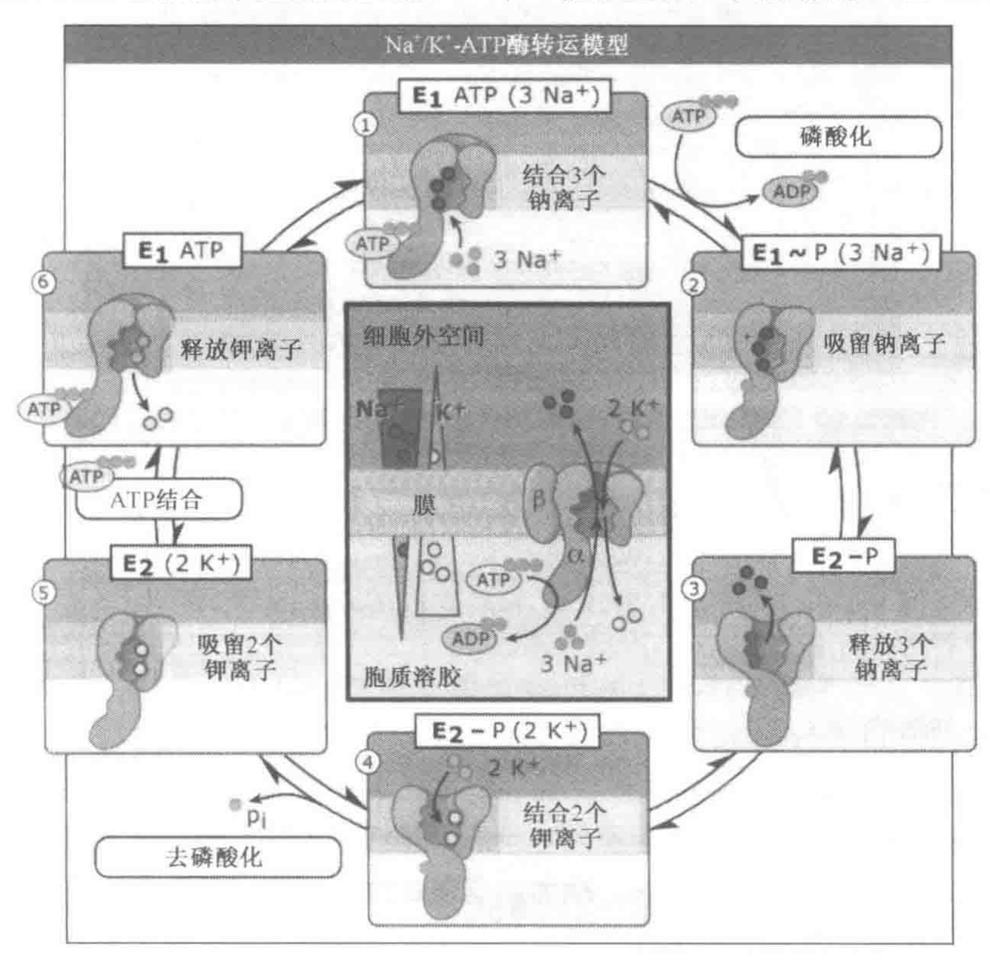


图 2.51 Na^+/K^+-ATPase 的 post-Albers 反应循环。$E_1 \sim P$ 表示高能磷酸键。中央的图版（panel）总结了循环反应，插图说明了静息的动物细胞中跨膜的 Na^+、K^+ 梯度。

是相似的，和一个 β 调节亚基，对于特定类型的 ATPase 它是独特的（见图 2.51）。较小的 β 亚基有一个可稳定 α 亚基的跨膜区域，该区域对恰当的跨膜插入是重要的。在一些组织中，有第三种蛋白 γ 亚基，其作用很可能是调节 Na^+/K^+-ATPase 的活性。由异种表达（heterologous expression）和电生理实验可知，α 催化亚基包括 ATP、Na^+、K^+ 结合位点，α 亚基独自催化转运。

冰冻电镜所确定的 Na^+/K^+-ATPase 的总体结构与 Ca^{2+}-ATPase SERCA 相似，如图 2.52 所示。Na^+/K^+-ATPase 的 α 亚基有一个 10 个跨膜 α 螺旋的区段，与 SERCA 泵类似（见图 2.49）。跨膜区段 4 和 5 之间的细胞内 P-区域包含磷酸化位点，它在所有的 P 型 ATPase 中都是高度保守的。这个可逆的磷酸化位点是特征性基序 Asp-Lys-Thr-Gly-Thr-Leu-Thr 中的 Asp376 残基。ATP 和 Na^+ 的结合诱导连接 N-和 P-区域的铰链区一个重大的构象改变，以至于 N-区域的 ATP 结合位点和 P-区域的磷酸化位点被拉得更近。

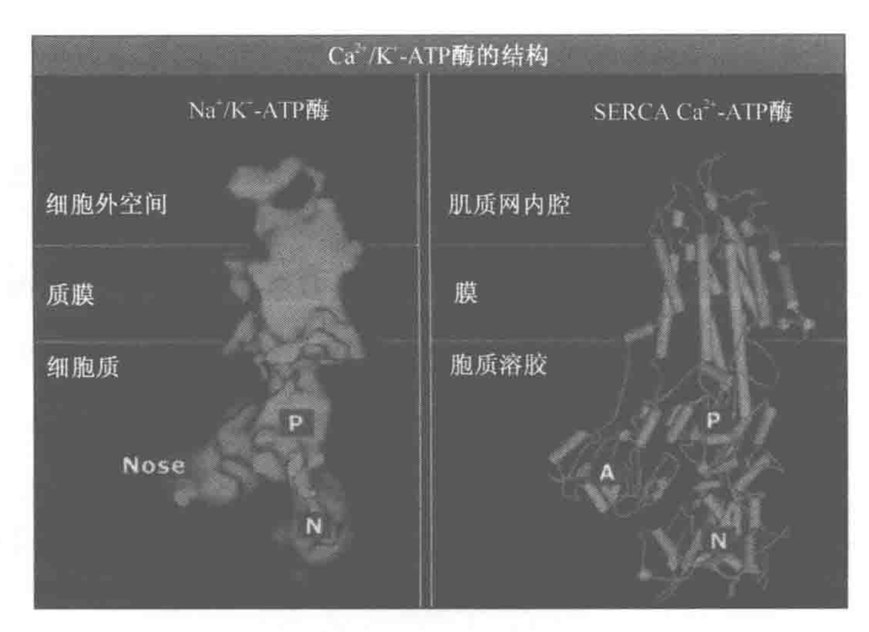


图 2.52　Na^+/K^+-ATPase 的 α 亚基在结构上与肌质网上的 Ca^{2+}-ATPase（SERCA）类似。Na^+/K^+-ATPase α 亚基的结构是由冰冻电镜确定的。SERCA X 射线晶体结构图（E2 构象）来自于 Protein Data Bank file 1IWO。Na^+/K^+-ATPase 结构来源是 Rice, W. J., et al. *Biophys. J.* 2001. 80：2187-2197。Copyright © 2001 by the Biophysical Society。

Na^+/K^+-ATPase 是一个产电的离子泵。在正常的生理条件下，ATP 水解的自由能（ΔG_{ATP}）推动 Na^+/K^+-ATPase 转运三个 Na^+ 出细胞而把两个 K^+ 泵入细胞，逆着它们各自的浓度梯度。这样，逆着跨细胞膜的电场产生了一股净正电流。这帮助创建了相对于细胞外液为负电性的细胞液。净向外电流既创建了跨膜的电位差，又创建了跨膜的渗透压离子梯度（膜电位的细节见 2.4 跨膜的电化学梯度产生膜电位）。

P 型 ATPase 是离子泵，它利用 ATP 水解的能量维持跨膜的离子梯度。因为这个循环反应中的每一步都是可逆的，P 型 ATPase 原则上能利用储存在膜电位中的能量产生 ATP。这样，Na^+/K^+-ATPase 就有潜在能力以反向模式（reverse mode）运转，以

致 Na^+ 可以被转运进细胞，K^+ 可以被转运出细胞，导致一个净向内电流。只要 ΔG_{ATP} 超过各自离子梯度的电化学能，Na^+ 转运出细胞，K^+ 转运进细胞的正常转运就能继续进行。当 Na^+ 和 K^+ 的主动运输所需要的能量等于 ΔG_{ATP} 时，没有净离子流。这代表了 Na^+/K^+-ATPase 的逆转电位（reversal potential），也就是说，当膜电位比这个低时，Na^+/K^+-ATPase 将会以反向模式（backward mode）运转。据估计逆转电位大约是 −180mV，比生理条件下发现的任何膜电位负得多。因此，不像会发生有害的向内的 Na^+ 电流。但是在心肌缺血（myocardial infarction）或中毒，血供应降低的情况下，这种状况是会改变的，中毒导致细胞 ATP 丧失或有更陡的离子梯度，最终能通过 Na^+/K^+-ATPase 逆转离子的运动方向，引起细胞死亡。

Na^+/K^+-ATPase 是很多毒素的靶点和重要的药物靶点。例如，自然存在的植物甾体（steroid）强心苷（cardiac glycoside）类，如乌本苷（ouabain）和毛地黄（digitalis），特异性抑制 Na^+/K^+-ATPase 的离子转运。其他毒素，像来自海珊瑚的岩沙海葵毒素（palytoxin）或植物中的血根碱（sanguinarine）也是特异性的抑制物。与强心苷通过 Na^+/K^+-ATPase 抑制离子流不同，岩沙海葵毒素和血根碱阻断 ATPase 使其处于打开状态（open state），允许离子顺着它们的浓度梯度流动，这就破坏了它们的电化学梯度。强心苷可逆地结合在 Na^+/K^+-ATPase 的细胞外侧，抑制 ATP 水解和离子转运。使用强心苷如毛地黄，仔细地滴定心脏中的 Na^+/K^+-ATPase 的抑制，对心脏病人来说是一种可供选择的治疗。用强心苷部分抑制 Na^+/K^+-ATPase 的一个亚群，稍微增加了细胞内的 Na^+ 浓度，由于 Na^+/Ca^{2+} 反向转运体的转运，这将导致细胞内更高的 Ca^{2+} 浓度。细胞内 Ca^{2+} 浓度的轻微增加会增强心脏的收缩性（见 2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。

2.20 F_1F_0-ATP 合酶将 H^+ 运动与 ATP 合成或水解耦联

关键概念

- **F_1F_0-ATP 合酶（synthase）是氧化磷酸化的关键酶。**
- **F_1F_0-ATP 合酶是一个多亚基分子马达，将把质子顺着它们的电化学梯度运动所释放的能量与 ATP 合成耦联。**

在氧化磷酸化过程中，ATP 的合成为真核细胞和几乎所有的原核细胞提供大量的细胞能量。这是一个多步骤的，在膜上进行的过程。一个习惯于静止生活方式体重 70kg 的人，在其 75 年的寿命中将产生两百万 kg ATP。在真核细胞中，ATP 合成是生物学上最频繁的一个酶反应，在被称为线粒体的特化的细胞器中发生。细胞内 ATP 合成是由 F_1F_0-ATP 合酶（F_1F_0-ATP synthase）催化的，这是一个不寻常的分子马达，它将跨膜的电化学质子梯度的能量（**质子驱动力，proton motive force**）与 ATP 合成耦联。电化学质子梯度是在氧化磷酸化的过程中由电子转移复合物产生的，这个梯度包括两个组分，膜电位和线粒体膜两侧的质子浓度差。

F_1F_0-ATP 合酶的总体结构在所有的细胞中是相似的，尽管亚基组成可以有所不同。最简单的 F_1F_0-ATP 合酶形式在细菌的质膜上，有 8 种类型的亚基，其化学计量为

$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon a\ b_2c_{10-14}$，总的分子质量大约是 530kDa。在线粒体中，7～9 个额外的调节亚基只占总分子质量的较小一部分。ATP 合酶有两个主要的结构域，如图 2.53 所示：

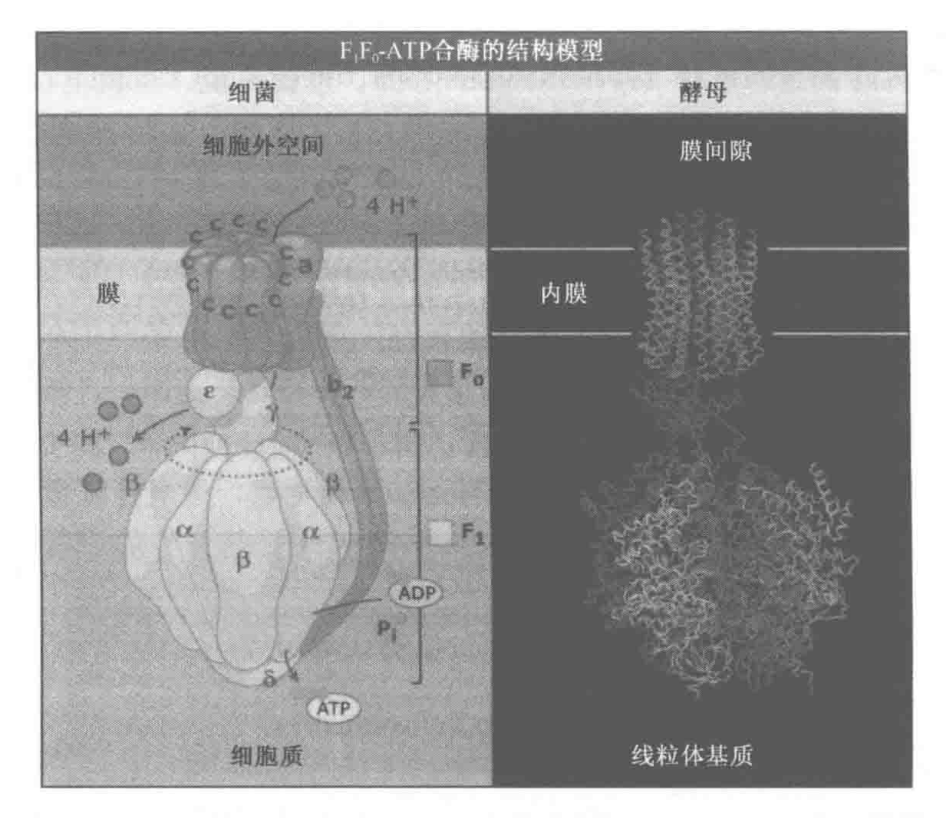


图 2.53　完整的 F_1F_0-ATP 合酶复合体示意图，来自大肠杆菌，此酶的部分 X 射线晶体结构来自酵母。酵母 F_1F_0-ATP 合酶的图片来自于 Protein Data Bank file 1Q01。指明了膜的假定的位置。

• 膜结合 F_0 区域（membrane-borne F_0 domain）（细菌中是 a b_2c_{10-14}），参与使质子顺着其电化学梯度易位。

• 球状的 F_1 区域（细菌中是 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$），含有负责 ATP 合成的催化位点（当 F_1 从 F_0 区域分离时，F_1 区域独自水解 ATP）。

F_0 区域的 c 亚基形成一个环状物（ring），与亚基 a 相互作用。γ 亚基形成一个中心转轴（rotor stalk），与 c 环（c-ring）在其基部连接并穿入 F_1 催化区域。F_1 区域是一个组合体，由三个 α 亚基和三个 β 亚基交替排列成六边形圆筒的形式围绕着 γ 亚基。外周定子轴（stator stalk）由 $b_2\delta$ 亚基构成，δ 亚基结合到 F_1 区域，b_2 固定 F_0 区域在线粒体膜中，并与 a 亚基相互作用。

F_1F_0-ATP 合酶怎样利用跨膜质子梯度的能量驱动 ATP 合成？提出的模型的基本部分是：

• 亚基 a 和 c 控制质子转运，以 c 环相对于亚基 a 旋转的方式（见图 2.53）。换句话说，电化学质子梯度的能量转换成 c 亚基的机械转动。

• 中心轴的 γ 亚基与 c 环一起旋转，并把跨膜质子驱动力与超过 100Å 距离的 F_1 区域耦联。

• 旋转的机械能被用来释放 ATP，ATP 的合成是由来自 F_1 区域的 β 亚基催化的。

因此，c 环的旋转和相对于 $\alpha_3\beta_3$ 亚域（subdomain）位于中心的 γ 亚基对于耦联跨

膜的质子驱动力来驱动 ATP 形成和释放是必不可少的。因为每一个 c 亚基携带一个质子，c 环每完成一次旋转，就有 10～14 个质子被转运（取决于特定的 ATPase）；每合成一个 ATP，大约有四个质子被转运。F_1F_0-ATP 合酶把电化学能量转换为机械能，然后又转回到化学能，几乎是 100%的效率。ATP 合成可以以每秒大约 100 个的最大速率发生，维持细胞内的 ATP 浓度在毫摩尔水平。

在一些细菌中，F_1F_0-ATP 合酶以相反的方向工作，ATP 水解释放的能量驱动质子转运出细胞，产生一个跨质膜的质子梯度。质子梯度的能量然后被用于驱动溶解物，如乳糖，转运进细胞（见图 2.37 和 2.15 同向转运体和反向转运体介导耦联转运）。

2.21 H^+-ATPase 把质子转运出细胞质

关键概念

- 质子浓度影响很多细胞功能。
- 细胞内隔室（compartment）被 V-ATPase 的活动酸化。
- 质膜上的 V-ATPase 在细胞外液酸化和细胞液 pH 调节方面发挥着特殊作用。
- V-ATPase 是包含多个亚基的质子泵，与 F_1F_0-ATP 合酶的结构相似。

因为蛋白质的功能通常是对 pH 敏感的，所以 pH 是影响大量细胞过程的一个重要的参数。细胞液中的代谢过程不断地产生酸分子，质子必须被去除来维持一个稳定的细胞液 pH。因此，转运质子的蛋白质在 pH 调节方面十分重要。例如，细胞液的 pH 对生长控制和所有代谢活动都具有普遍的重要性，细胞液 pH 可以由膜转运体如 Na^+/H^+ 交换器调节（见 2.17 一些 Na^+ 转运体调节细胞内或细胞外 pH）。另外，线粒体为细胞液中产生的质子提供了一个落水洞（sink），因为线粒体内膜上的 F_1F_0-ATP 合酶利用质子驱动力来推动 ATP 合成（见 2.20 F_1F_0-ATP 合酶将 H^+ 运动与 ATP 合成或水解耦联）。

细胞液维持一个稍微偏碱性的 pH，与细胞液相比，一些细胞器的功能需要酸性环境。这些隔室（compartment）包括胞吞途径（网格蛋白-包被小泡、内体、溶酶体）和胞吐途径上的那些细胞器和小泡（分泌颗粒）。空泡型质子泵（vacuolar-type proton pump）（V-ATPases）是 H^+-ATPase，对于维持这些细胞器的 pH 是必需的，细胞器的 pH 在 4.5～6.8 的范围内。V-ATPase 组成一个 ATP 驱动的质子泵家族，把质子从细胞液跨膜转运进细胞器内腔。它们在胞吞和细胞内靶向运输方面有着重要作用，如图 2.54 所示。早内体的酸化需要内体中内化的配体-受体复合物解离，细胞膜受体再循环到质膜上。H^+- ATPase 也酸化晚内体，是溶酶体酶投放所需要的，如那些来自于高尔基体反面网状结构含有甘露糖-6-磷酸靶向信号的溶酶体酶。在分泌颗粒中，如突触小泡和嗜铬颗粒（chromaffin granule），质子梯度和（或）由 H^+-ATPase 产生的膜电位为耦联转运和颗粒中小分子和离子的储存提供驱动力。例如，在突触小泡中，去甲肾上腺素（noradrenaline）的吸收取决于质子梯度，而谷氨酸吸收取决于膜电位。一些包膜病毒，如流感病毒，启动内体隔室酸化使病毒得以进入，这时病毒蛋白血凝素（hemagglutinin）被低 pH 激活并推动病毒和内体膜之间的融合（胞吞和胞吐途径的细节分别见 4.3 胞吞途径概述和 4.2 胞吐途径概述）。

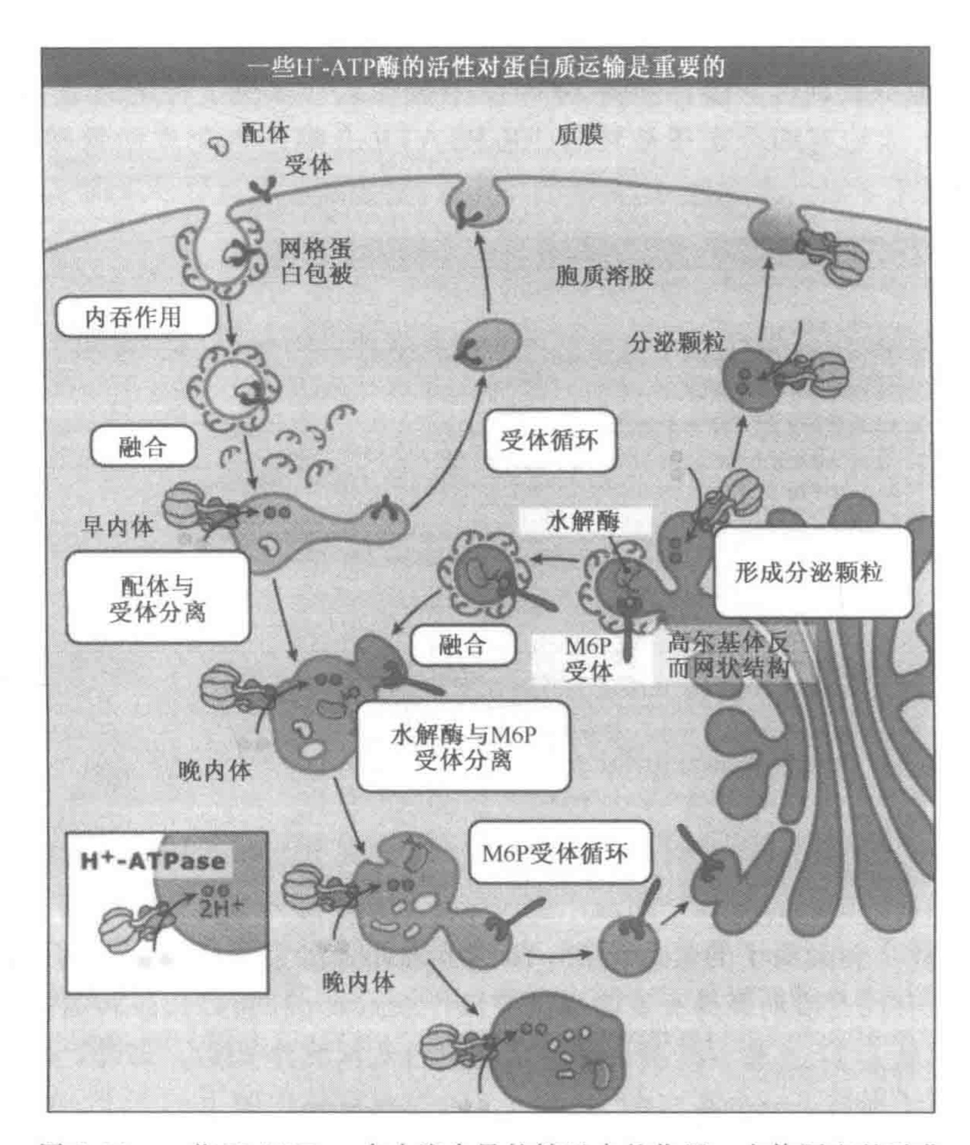


图 2.54　一些 V-ATPase 在小泡介导的转运中的作用。内体隔室的酸化对蛋白质-受体复合物的解离和受体再循环十分重要。另外，H^+-ATPase 是分泌颗粒形成所需要的。

其他的 H^+-ATPase 在某些特化细胞的质膜上发挥功能，如肾闰细胞（renal intercalated cell）、嗜中性白细胞和破骨细胞（osteoclast），H^+-ATPase 分别在尿的酸化、细胞质 pH 维持和骨吸收方面发挥重要作用。肾闰上皮细胞的顶膜含有高密度的 H^+-ATPase，它活跃地分泌质子进入尿液，如图 2.55 所示。这些 H^+-ATPase 的突变会引起质子排出的缺陷，导致肾脏调节血液 pH 的能力降低以及肾和代谢酸中毒。在由于代谢活性而大量产酸的情况下，巨噬细胞和嗜中性白细胞依赖质膜上的 H^+-ATPase，维持细胞内中性 pH。在骨重建的过程中，破骨细胞附着到骨基质上，并把 H^+-ATPase 靶向到正在活动的接触区。细胞外接触区的酸化帮助骨基质溶解以及激活参与骨吸收的水解酶。

H^+-ATPase 是多亚基蛋白复合物，它形成两个功能域 V_1 和 V_0，如图 2.56 所示。细胞质 V_1 区域结合和水解 ATP，ATP 水解的自由能提供质子跨过膜结合 V_0 区域（membrane-bound V_0 domain）转移所需的能量。根据电镜、蛋白质交联实验（protein crosslinking experiment）和位点专一诱变（site-directed mutagenesis）提出了 H^+-AT-

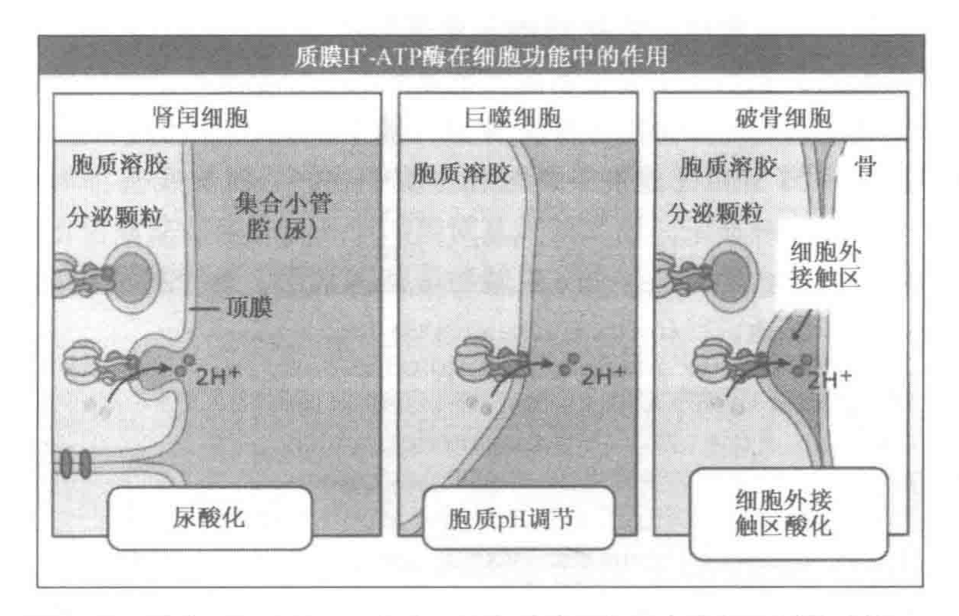


图 2.55 质膜 H^+-ATPase 在特化的各种类型细胞中发挥不同的功能。

Pase 的结构。尽管泵的确切的组分到目前为止还没有确定，生化研究提示，640kDa 的细胞质 ATP 结合 V_1 区域由 A～H 亚基以 $A_3B_3C_1D_1E_1F_1G_2H_1$ 的化学剂量组成。而 260kDa 的质子泵 V_0 区域包括 5 种亚基，以 $a_1d_1c'_1c'_{1'}c_4$ 复合物形式存在。

H^+-ATPase 与 F_1F_0-ATP 合酶有关系，F_1F_0-ATP 合酶的功能是以相反的方向（opposite direction）在线粒体、叶绿体和细菌中产生 ATP（见 2.20 F_1F_0-ATP 合酶把 H^+ 运动与 ATP 合成或水解耦联）。这两种类型的酶有两个相似的结构域，F_0 或 V_0 和 F_1 或 $V_{1'}$（见图 2.53）。V_1 区域包括在 B 亚基上的非催化核苷酸结合位点和在 A 亚基上的催化性 ATP 结合位点，是由位点专一诱变和巯基试剂修饰（modification by sulphydryl reagent）确定的。因为结构是相似的，基于对 F-ATP 合酶更深入的了解，提出了 H^+-ATPase 的机制。

图 2.56 H^+-ATPase 的示意图模型。H^+-ATPase 通过膜内在的 V_0 区域，把质子从细胞液转运到小泡内腔或转运到细胞外空间。细胞质 V_1 区域把 ATP 水解的自由能与质子转运耦联。

F-ATP 合酶的功能被认为是一个旋转马达，在这个旋转马达中，质子梯度驱动 c 亚基环（ring）旋转，c 亚基环与在 F_0 区域的 a 亚基有关联。旋转所产生的能量通过中心的 γ 和 ε 亚基轴（stalk）进入 F_1 环（ring）结构，并被用来推动 ATP 合成及由 α 和 β 亚基释放。c 亚基含有天冬氨酸残基，它对质子转运是必需的，亚基 a 被认为允许质子进入这些位点。

图 2.57 显示 H^+-ATPase 的类似模型。在这个模型中，V_1区域 ATP 水解的能量被

转移到 c 环的旋转和质子转运。V_0区域的 a 亚基转运质子，是经由位于 C 端那半截的九个预测的跨膜区段。亚基 a 中带正电荷的精氨酸残基将稳定一个带负电荷的谷氨酸残基，它位于质子化之前的一个 c 亚基中。亚基 a 将利用两个半孔道结构（hemichannel sructure）转运一个质子并可逆地使谷氨酸残基质子化，谷氨酸残基将与 c 亚基中的精氨酸残基相互作用而释放质子。精氨酸残基对下一个 c 亚基上的非质子化的谷氨酸的静电吸引将会使 c 环旋转，带动每一个 c 亚基与 a 亚基接触。这个机制将允许 ATP 水解来驱动单方向的质子转运。

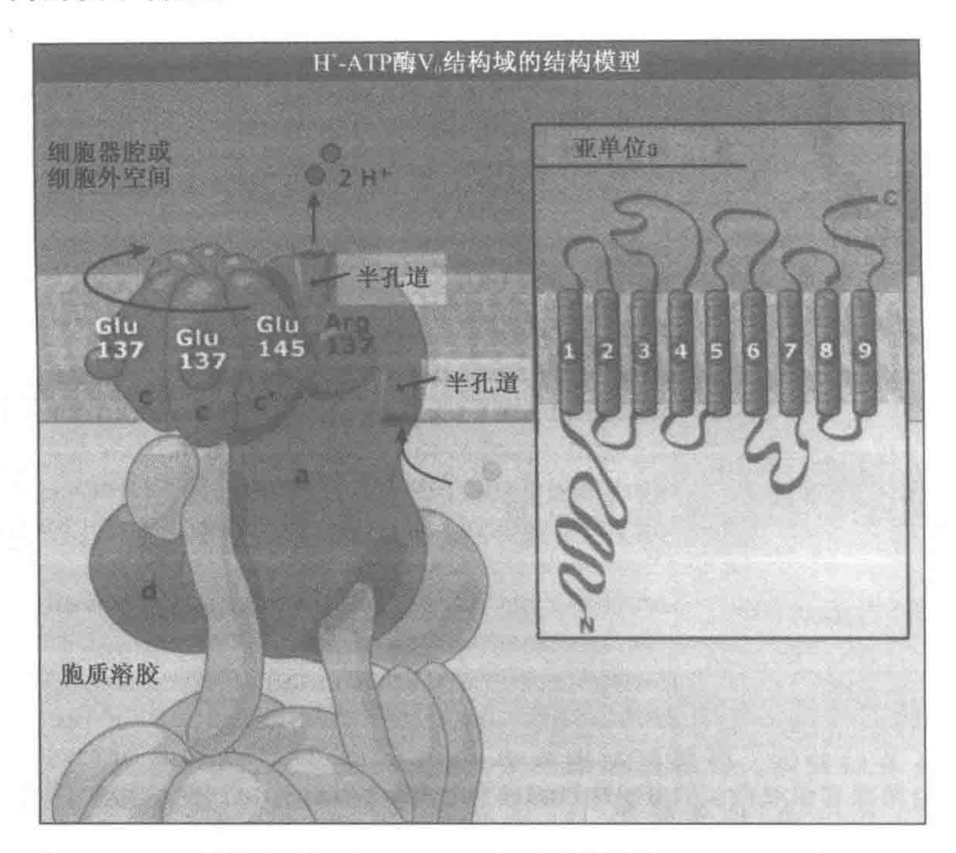


图 2.57　c 环旋转和质子通过 V_0 区域运动的模型（由 V_1 区域 ATP 水解驱动，没有显示）。插图显示预测的 V_0 区域的亚基 a 的拓扑结构，该结构由突变和化学修饰实验得到。

H^+-ATPase 的活性可由几种机制调节。一种机制涉及调节靶向定位以及含有质子泵的细胞内小泡与质膜融合。例如，在肾闰细胞中，含有 H^+-ATPase 的分泌小泡可逆地与顶膜融合来应答细胞酸度的增加。第二种机制是，在靠近亚基 a 催化位点的保守的半胱氨酸之间形成二硫键，导致可逆的 ATPase 活性抑制。第三种机制是，在一定的条件下，进入 V_1 和 V_0 区域的复合物的可逆解离可能是控制 H^+-ATPase 活性的一个重要机制。

2.22　展望

最近在膜转运领域的突破是离子通道在原子水平上的可视化。例如，X 射线晶体结构分析革新了我们对一些离子通道和水通道的选择性和通透性原理的理解。然而，X 射线晶体结构只对于相对少的部分膜转运蛋白是可获得的，在很多情况下，这些结构大部分来自于细菌蛋白质，它可以被大量制备。其他转运蛋白的晶体结构分析将允许更多的

普遍原理显现。另外，真核细胞转运蛋白的晶体结构分析将为观察更复杂的过程如神经元的功能形成一个基础。

晶体结构在引导提出膜转运蛋白怎样工作的模型方面是非常宝贵的。利用核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）和其他光谱的方法得到实时的转运蛋白图片，通过提供动力学上的构象，将补充晶体结构的工作，如蛋白质从一种构象改变到另一种构象，离子通道从关闭构型变为开放构型是否被门控，或载体蛋白在结合和释放溶质时发生的构象变化。

大批膜转运体、离子通道和泵已经在遗传或功能水平上被确定。基因组学（genomics）和蛋白质组学（proteomics）方法将使甚至更多的转运蛋白被确定。另外，除了知道孔形成亚基对于一些转运蛋白的功能是必需的，其他这样的亚基的确定对我们完全理解转运蛋白的功能怎样被调节十分重要。微阵列（microarray）和蛋白质组分析（proteomic analysis）也将允许比较正常细胞和疾病细胞中转运蛋白表达水平和它们的有关的调节因子。

作为一个长期的目标，在细胞和生物有机体中，十分需要将来自结构分析的信息与更多的生理上的前因后果联系起来。我们需要能够研究在液体或细胞内环境中的转运蛋白，来检验提出的转运和调节机制。许多疾病已经与膜转运蛋白的变异相联系。但是，为了理解某个特别的离子通道在疾病中的作用，理解该类离子通道在整个细胞和最终在器官及组织水平的功能是很重要的。例如，已经显示，在囊性纤维变性（cystic fibrosis）跨膜传导调节者（CFTR）CL- 通道中的突变，引起患有囊性纤维变性的病人的肺和消化道腔中 Na^+ 的重吸收不正常，导致黏液梗阻（sticky mucus），这阻碍一系列器官的活动，这些器官需要依赖这种类型的上皮转运功能。这类研究将需要新的生物分析手段的发展，来检验特定的功能。从分子水平上理解细胞中所有不同通道的功能，将会帮助阐明构成神经网络更高度活性的机制，或理解导致心律失常和心脏性猝死的电异常。

2.23 总结

三类主要的膜转运蛋白：通道、转运体和泵的特性都介绍过了。这些蛋白质定位在质膜和细胞内细胞器的膜上，如内质网、内体、溶酶体和线粒体膜。对于无数的细胞功能，从营养物质如葡萄糖的吸收，到更复杂的生理工作如肾脏对溶解物的重吸收和动作电位的传播，膜转运蛋白都发挥着重要作用。

通道有孔，允许离子或其他溶解物跨过生物膜进行快速的被动扩散。通道的选择性程度不同：一些通道对 K^+、Na^+、Ca^{2+}、Cl^- 或水有高度的选择性，而其他通道对某一特定阴离子或阳离子具有选择性。离子通道的一个区域造成了选择性，这个区域叫做选择性过滤器，它可使透过的离子部分脱水，在能量上比其他相似大小的离子有利。离子通道的打开和关闭经受一个被称为门控过程的调节，门控与许多不同类型的调节耦联。例如，离子通道可以是配体门控、电压门控、牵张激活或温度激活。通过通道孔的净离子转运的方向取决于该离子种类的电化学梯度，转运与跨膜电流的流动相关联。几种通道蛋白的总体结构特征已经被描述，已经提出了模型来说明它们的选择性、快速的转运速率以及门控的机制。

转运体和质子泵是溶质选择性载体蛋白，它们的转运机制与通道不同。这些通道蛋

白在两种基本构象之间交替：一种构象在膜的一侧结合溶质，另一种构象在膜的另一侧释放溶质。转运体和泵使用不同的能源来完成转运。转运体将转运与储存在跨膜电化学梯度中的能量耦联。相对比的是，泵利用来自于 ATP 的能量或外源能量（光）驱动转运。

跨细胞膜的电化学梯度是由不同类型的膜转运蛋白相互作用建立起来的。细胞代谢能量的一大部分用在建立跨细胞质膜或跨细胞内膜的离子梯度上。例如，Na^+/K^+-ATPase 帮助建立跨膜的 Na^+ 和 K^+ 梯度。通道蛋白和载体蛋白利用储存在质膜上的电化学梯度来进行工作。例如，电压门离子通道利用这些梯度产生电信号，或其他类型的离子通道利用这些梯度激活细胞内信号转导通路，来控制细胞体积或介导流体或电解质转运。另外，转运体利用一种溶质的电化学梯度的能量来逆着能量向上的梯度转运另一种溶质。

离子通道、转运体、泵蛋白的突变或失调能引起缺失性功能缺陷或获得性功能缺陷。很多离子通道疾病影响神经元和肌肉细胞，并引发像癫痫、共济失调、肌强直和心律失常这样的疾病。离子通道疾病影响其他器官的例子是肾脏的囊性纤维变性、肾的盐消耗 Bartter's 综合征（salt-wasting Bartter's syndrome）、胰腺的胰岛素分泌缺陷、肾结石和骨硬化（osteopetrosis）。离子通道突变的后果帮助我们理解离子通道的功能以及它们在器官生理上的作用。

2.24 补充：能斯特方程的推导和应用

相反的（opposing）化学力和电场力之间的平衡确定静息膜电位（讨论见 2.4 跨膜的电化学梯度产生膜电位）。当这些力之间的自由能差值为零时达到这个平衡（换句话说，当净电流 =0）：

$$\Delta G_{conc} + \Delta G_{elec} = 0$$

溶解物 X 跨膜运动的自由能改变是：

$$\Delta G_{conc} = -RT\ln\left(\frac{[X]_o}{[X]_i}\right)$$

R：气体常数（$2cal\ mol^{-1}\ K^{-1}$）

T：绝对温度（K；37℃=307.5K）

$[X]_o$：细胞外 X 浓度

$[X]_i$：细胞内 X 浓度

由于与溶质 X 相关联的电荷跨膜移动，自由能改变是：

$$\Delta G_{elec} = zFE_m$$

E_m：平衡电位（伏特）

z：离子的（化合）价（电荷）

F：法拉第常数（$2.3\times10^4\ cal\ volt^{-1}mol^{-1}$）

在平衡时，

$$zFE_m = RT\ln\left(\frac{[X]_o}{[X]_i}\right)$$

整理得出

$$E_m = \left(\frac{RT}{zF}\right)\ln\left(\frac{[X]_o}{[X]_i}\right)$$

这样，一个单价离子在37℃的平衡电位或能斯特电位（Nernst potential）为：

$$E_m = 61.5\ \log_{10}\left(\frac{[X]_o}{[X]_i}\right)\text{millivolts (mV)}$$

当离子浓度被测定后，能斯特方程能被用来计算每一种离子的平衡膜电位。图2.58显示的是对于肌肉细胞质膜这些计算的结果。这样，对 $[K^+]_o = 4$ mmol/L 和 $[K^+]_i = 155$ mmol/L 来说，当只考虑 K^+ 流时，膜电位 $E_m = -98$mV，也就是说，$E_m = EK^+$。

离子浓度和平衡电位				
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Cl^-
胞外浓度(mmol)	145	4	1.5	123
平衡电位(mV)	+67	−98	+129	−90
胞内浓度(mmol)	12	155	10^{-4}	4.2

图2.58　哺乳动物骨骼肌细胞自由离子浓度和平衡电位。在37℃下计算平衡电位，认定的肌肉细胞膜静息电位是−90 mV。顶上标明了非水合离子的相对半径。

对几乎所有的静息哺乳动物细胞来说，质膜偏爱透过 K^+。Na^+/K^+-ATPase 维持跨膜的 K^+ 梯度，创建一个相对高的细胞内 K^+ 浓度（$[K^+]_i$）。一定类型的 K^+ 通道打开，允许 K^+ 顺着它们的浓度梯度流动，这使细胞膜的外侧带正电而细胞内侧带负电。负的膜电位 E_m 是电驱动力，它对抗进一步的 K^+ 沿着浓度梯度（化学驱动力）流出细胞。这样，静息细胞中选择性 K^+ 离子通道的一个专门子通道（specialized subset）的打开决定了负的静息膜电位的水平，在这种情况下，没有净跨膜 K^+ 流发生，并且 E_m 是稳定的。

其他种类的离子也可以经计算得到相似的能斯特电位。如果膜对某种给定的离子有更高的通透性，那么膜电位 E_m 将会朝着那种离子的能斯特电位改变（典型的，在膜去极化的过程中变得更正）。

例如，如果细胞膜变得对 Na^+ 更有通透性，Na^+ 将会顺着其浓度梯度流动，因此使细胞膜的外侧更负，细胞内侧更正。静息细胞在生理条件下，少数 Na^+ 通道打开，和通过渗漏而来的 Na^+ 内流一起，将引起向内的 Na^+ 流，驱动静息膜电位变得稍微更正（例如−82mV）。与此相比，纯的 K^+ 传导导致静息膜电位为−89 mV，如上面所计算的。在对 K^+ 通透性较小的细胞类型中，在同样的 Na^+ 渗漏以及其他去极化离子流背景下，细胞静息膜电位 E_m 处于更正的状态（例如−50 mV）。当一个细胞变得电兴奋，并且 Na^+ 通道打开时，向内的 Na^+ 流和向外的 K^+ 流之间的理论平衡限定膜电位水平更靠近 E_{Na}（而不是 E_k）。根据能斯特方程，在37℃下 Na^+ 的平衡电位是：

$$E_{Na^+} = 61.5\ \log_{10}\left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i}\right)$$

如果 $[Na^+]_o$=145mmol/L，$[Na^+]_i$=12mmol/L（见图 2.58 中的肌肉细胞），若只考虑 Na^+ 流时，膜电位 E_m= +67 mV。这样，打开的 Na^+ 通道净效应将是一个向内的 Na^+ 流，引起负的静息膜电位 E_m 向+67 mV 移动。

同样的，当细胞膜变得对 Ca^{2+} 的通透性更高时，Ca^{2+} 将顺着其浓度梯度流动，会使细胞膜电位在细胞外侧更负而在细胞内侧更正。当细胞处于电兴奋并且 Ca^{2+} 通道打开，向内的 Ca^{2+} 流和向外的 K^+ 流之间的理论平衡限定膜电位水平更靠近 $E_{Ca^{2+}}$ 的。根据能斯特方程，

$$E_{Ca^{2+}} = \left(\frac{RT}{2F}\right)\ln\left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i}\right) = 30.75\ \log_{10}\left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i}\right)$$

如果 $[Ca^{2+}]_o$= 1.5 mmol/L，$[Ca^{2+}]_i$= 0.1 μmol/L，如图 2.58 中的肌肉细胞，膜电位 E_m= +129mV。这样，Ca^{2+} 通道打开的净效应将是一个净的向内 Ca^{2+} 流，引起负的静息 E_m 向+129 mV 移动 [关于动作电位，Ca^{2+} 通道比 Na^+ 通道在打开时的电位更正，这就意味着它们在动作电位的后期阶段打开（见 2.12 动作电位是依赖多种离子通道的电信号）]。

对 Cl^- 来说，根据能斯特方程，

$$E_{Cl^-} = -\left(\frac{RT}{F}\right)\ln\left(\frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}\right) = -61.5\ \log_{10}\left(\frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i}\right)$$

如果 $[Cl^-]_o$=123 mmol/L，$[Cl^-]_i$= 4.2 mmol/L，那么仅对于 Cl^-，膜电位 E_m= −90mV。这样，Cl^- 通道打开的净效应将是一个净的 Cl^- 流出，这可稳定负的静息膜电位 E_m。

2.25 补充：大部分 K^+ 通道都经历整流

关键概念

- 向内的整流（inward rectification）通过电压依赖的孔道阻断发生。

不同的 K^+ 通道怎样允许膜电位的瞬时变化发生并致力于膜去极化的终止？大部分离子通道都经历某种形式的**整流（rectification）**，整流就是应答膜电压改变的离子传导性（ion conductance）的变化。**向内的整流（inward rectification）**意思是离子通道传导向内的电流（current）要比向外的电流大。向内整流器（inward rectifier）K^+（Kir）通道家族就是其中的一个例子，它在进化上是高度保守的。向内整流涉及膜去极化过程中 K^+ 传导性降低，以及在膜复极化的过程中 K^+ 传导性增加，使得膜电位更负。没有向内整流，K^+ 传导性将会是一个常数。然而，在弱的向内整流情况下，在膜电位比 K^+ 平衡电位更正时，向外的 K^+ 电流降低。如果是强的向内整流，向外的 K^+ 电流在膜电位更正时被完全阻断。向内整流功能的两个例子是，静息的膜电位维持在负电压；在心脏动作电位的长平台期，向外的 K^+ 流失活（deacdtivation）来保持细胞内的 K^+ 浓度。Kir 通道引导 K^+ 流出静息的细胞，但是在去极化时被阻断。这是有意义的，因为去极化是由于 Na^+ 转运进细胞，同时带正电荷的 K^+ 的外流将对抗或减慢膜的去极化。

根据他们的整流程度，通道可被分类。强向内整流通道在一个特定的膜电位之上显现传导性锐减，而弱向内整流器继续转运离子，只不过以一个较低的速率。向内整流通

道可以是2TM/1P或是6TM/1P类型。强整流通道如Kir属于K^+通道的2TM/1P类型，如图2.59所示。各种Kir通道是配体门通道，受不同的分子如Mg^{2+}、多胺(polyamine)、ATP或三聚体G蛋白调节。在Kir通道，正电位时K^+电流的降低缘于孔道从细胞质一侧被阳离子如Mg^{2+}或高亲和性配体如多胺阻断。与向内整流器通道相比，向外或延迟的整流器通道是6TM/1P类型，是电压依赖的或K_v通道。当更多的通道打开，膜电位更正时，随着膜去极化，Kv通道传导性增加。然而，个别的通道并未表现出整流性质，这属于向外或延迟的整流，因为这些通道的活化相对慢。

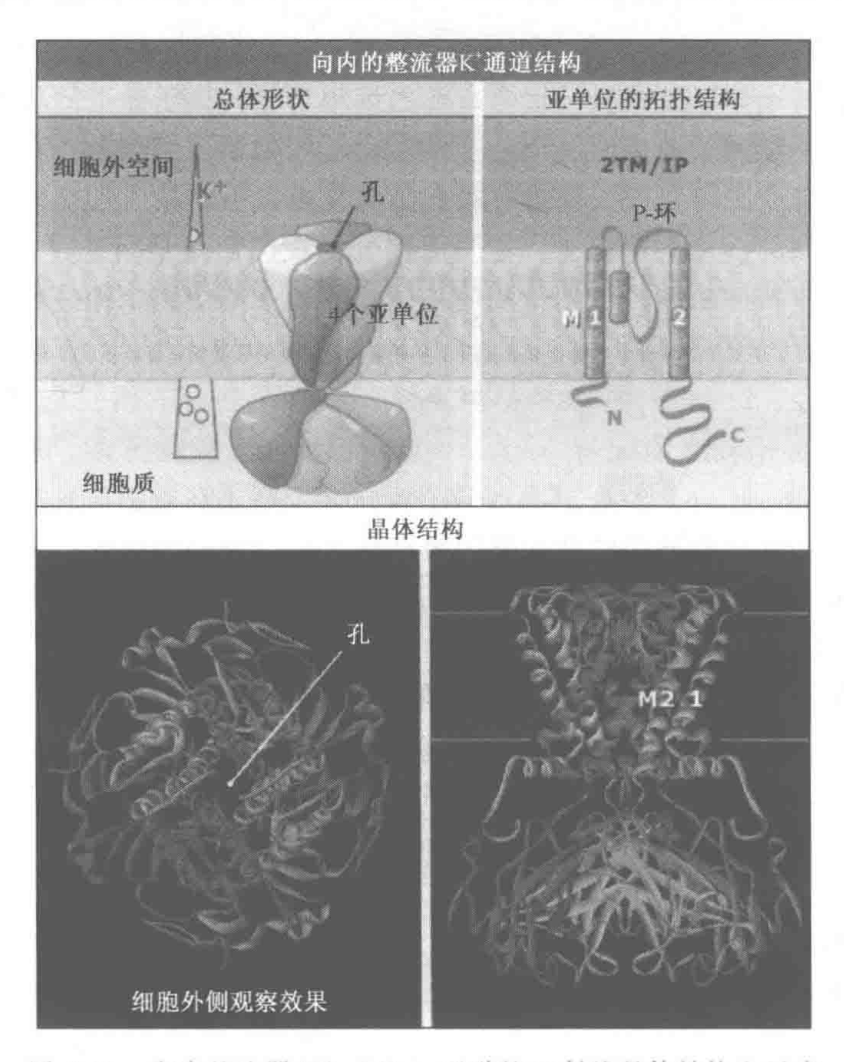


图2.59　向内整流器K^+（Kir）通道的X射线晶体结构和示意图。孔区域和其他K^+通道的孔区域是相似的。晶体结构图来自于Protein Data Bank file 1P7B。细胞外的视图比细胞侧面视图小。指出了膜的假定位置。顶上左边的插图表明静息的动物细胞中的K^+梯度。

向内整流器ATP敏感K^+通道（K_{ATP}通道）是通道整流器重要性的一个例子，K_{ATP}通道是细胞代谢和电活动之间的重要连接者。在胰岛β细胞中，当葡萄糖和ATP浓度增加，引起K_{ATP}通道持续的关闭和膜去极化时，能够触发胰岛素的分泌。K_{ATP}通道由孔道形成Kir6.2的α亚基和调节亚基组成，它们作为一个代谢传感器来控制K^+通道的活性。无论哪一个亚基的突变都会导致K_{ATP}通道功能的丧失和持续的膜去极化，伴随着胰岛素不依赖于血糖的水平而持续分泌。这种非控制的胰岛素分泌可能导致婴儿

期病理性低血糖和神经损伤。

2.26 补充：阴离子通道的突变引起囊性纤维变性

关键概念

- 囊性纤维变性（cystic fibrosis）是由编码 CFTR 通道的基因突变引起的。
- CFTR 是一个阴离子通道，可以转运 Cl^- 或 HCO_3^-。
- 囊性纤维变性分泌功能的缺陷影响多个器官。

离子通道、转运体以及泵执行很多重要的细胞功能，离子通道的功能障碍能在很多组织中引起疾病。在离子通道情况下，这些疾病被叫做离子通道病（channelopathies）。离子通道基因的突变既可以引起获得性功能缺陷又可以引起缺失性功能缺陷，这就解释了发生于特定疾病的病理生理改变。在先前部分，我们简单地讨论了多种离子通道病，它们影响肾脏上皮转运功能，引发骨病的不同器官的分泌功能，神经或肌肉异常，以及心律失常和猝死（见 2.8 上皮 Na^+ 通道调节 Na^+ 的内稳态；2.12 动作电位是依赖多种离子通道的电信号；2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌的例子）。在本节，我们将讨论**囊性纤维变性（cystic fibrosi）**，这是一个突出的离子通道病变，随着我们对上皮跨膜转运的改变（alteration）特征更深入的了解，这个病正在被更好地理解。

囊性纤维变性是最普通的致命的基因突变病之一，由一个编码被称为囊性纤维变性跨膜传导调节者（CFTR）的阴离子通道的基因的隐性突变引起。CFTR 的功能是作为一个 ATP 门控阴离子通道，在上皮细胞的顶膜表达，并受到蛋白激酶 A 的磷酸化调节。CFTR 是转运体大家族的一员，它包含 ATP 结合盒（ATP binding cassette，ABC）。总体上，ABC 转运体是以 ATP 为动力的泵（ATP-powered pump），跨膜转运范围广泛的底物，包括氨基酸、多肽、离子、糖类、毒素、脂类以及药物。除了囊性纤维变性，ABC 转运体的突变还引发许多其他疾病，包括免疫系统失调、对抗生素和癌症药物的抗性等。

CFTR 跨膜转运 Cl^- 或 HCO_3^-，如图 2.60 所示。CFTR 转运 Cl^- 是将有功能的 CFTR 通道纯化和重构在脂质体中来显示的。CFTR 的功能受细胞内的第二信使——环 AMP（cAMP）调节。cAMP 水平增加可以激活蛋白激酶 A，蛋白激酶 A 磷酸化 CFTR，由此激活阴离子通过 CFTR 转运。经过 CFTR 通道的跨上皮氯离子转运是由 Na^+ 梯度驱动的，Na^+/K^+-ATPase 的活性和位于上皮细胞顶膜的 Na^+ 通道（ENaC）维持这个梯度。CFTR 通道产生一个向内的 Cl^- 流，Cl^- 流和 ENaC 一起允许 Na^+ 和 Cl^- 跨细胞膜的电中性转运（electroneutral transport）。基底外侧膜上的 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共转运体介导在激素刺激之后，Cl^- 转运进细胞。

CFTR 在各种上皮细胞的顶膜表达，包括肠道、肺、胰腺和汗腺的上皮细胞。液体的分泌对于这些器官的功能来说是重要的。例如在肺中，覆盖气道表面上皮细胞的薄层液体对纤毛清除黏液层是必须的，黏液层从气道中捕获颗粒和细菌。CFTR 对产生和校正这个液体的离子成分是重要的。患有囊性纤维变性的病人，黏液层的黏性比正常的大，这抑制了致病菌的清除，因此支气管对细菌感染的抵抗性降低。黏液的堆积最终引起呼吸衰竭。另外，消化道、胰腺和肝脏被黏液阻塞能引发消化不良和营养不良。液体

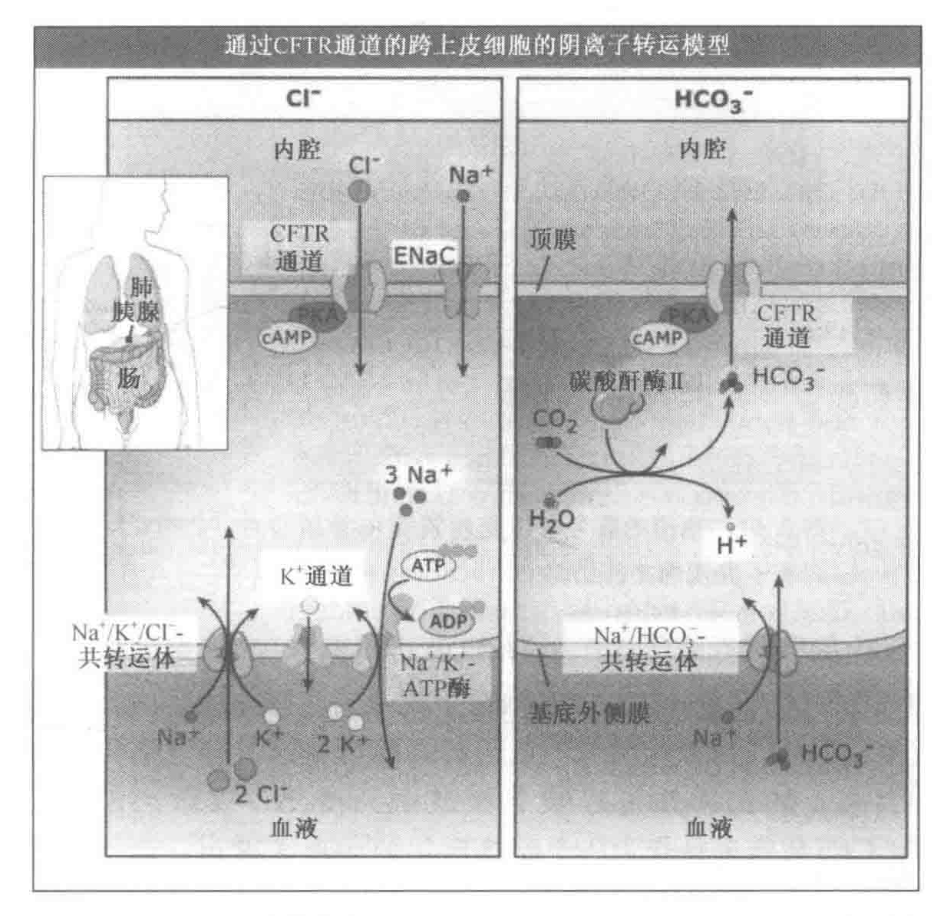


图 2.60　经过 CFTR 通道的跨上皮氯离子转运和碳酸氢盐转运。位于顶膜的 CFTR 在靠近上皮 Na^+ 通道的状态下工作，并抑制上皮 Na^+ 通道（ENaC）。CFTR 功能的降低导致通过上皮细胞层的 Na^+ 和水重吸收增加。

从顶膜分泌的过程中，CFTR 行使功能需要与上皮细胞顶膜和基底外侧膜上的其他转运蛋白联合工作（见图 2.60）。CFTR 的功能对液体分泌是重要的，因为盐的转运（以 Na^+ 和 Cl^- 的形式）为水的跨膜转运提供渗透驱动力（osmotic driving force）。

CFTR 蛋白含有两个核苷酸结合折叠（nucleotide-binding fold，NBF）和在细胞质区段的一个唯一的调节（R）域和两个跨膜区域，如图 2.61 所示。每一个跨膜区域由六个跨膜区段组成，这两个区域和核苷酸结合结构域一起形成一个串联重复结构。每一个核苷酸结合结构域包含一个 ATP 相互作用区段，这个相互作用区段含有一个由 WalkerA 序列基序形成的磷酸基结合环，这个基序在很多 ATP 结合蛋白中是保守的，包括 F_1F_0-ATP 合酶。*CFTR* 基因几百种不同的突变都与囊性纤维变性有关系，但是最普遍的突变是一个缺失突变，导致 CFTR 蛋白缺少 Phe508，功能缺失，这个氨基酸残基正常情况下位于 NBF 的氨基端。CFTRΔPhe508 蛋白并不被转运到质膜上，而是由于有蛋白质运输方面的缺陷被留在内质网中。

因为 CFTR 是一个通道，离子顺着它们的电化学梯度转运，而没有额外的能量需要。为什么 CFTR 要结合 ATP？一些 ABC 转运体的 NBF 水解 ATP，这些转运体利用 ATP 水解的能量来跨膜泵出底物。与此相比，CFTR 的门控显出是被它的羧基端 NBF 内部的腺苷酸激酶（intrinsic adenylate kinase）活性调控的，该酶催化把 ATP 上的磷酸基转移到 AMP 上形成 ADP。有一个机制提出，ATP 结合可以诱导 NBF 二聚化并引

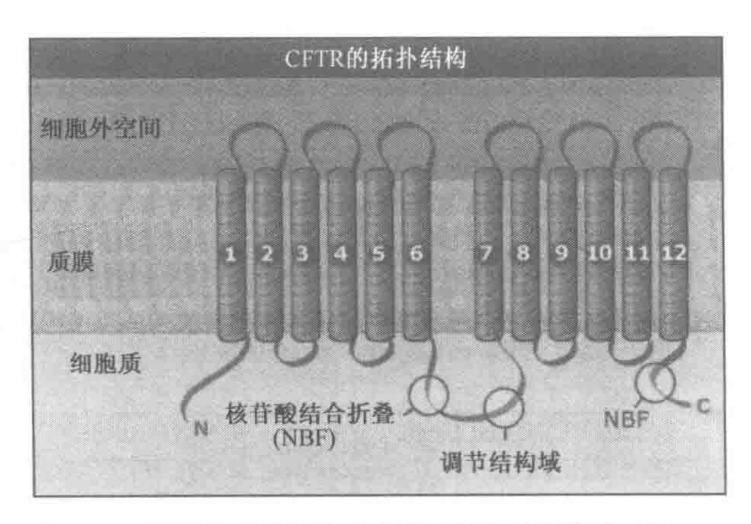


图 2.61 预测的囊性纤维变性跨膜传导调节者（CFTR）阴离子通道的拓扑结构。

起通道打开，而由腺苷酸激酶活性产生的 ADP 将引起 NBF 二聚体分离以及通道关闭。CFTRΔPhe508 突变在一个假设的 NBF 内面干扰通道功能并破坏功能性通道的表达。

CFTR 活性也能以其他方式调节。通道的调控可以通过调节结构域的磷酸化发生。另外，CFTR 阴离子的选择性可以被谷氨酸激活变更，以致通道传导 Cl^- 而不是 HCO_3^-。这样，CFTR 看来是作为一个配体活化的阴离子通道，而不是作为一个 ATP 依赖的泵。

在囊性纤维变性中，CFTR 通道的遗传缺陷破坏了跨上皮转运，因而扰乱了众多器官的阴离子分泌及液体分泌。基本的假说断定 CFTR 首先是作为一个 Cl^- 通道发挥作用，把 Cl^- 转运进细胞来产生一个低盐的气道表面液体层，并抑制由 ENaC 重吸收 Na^+。在囊性纤维变性中，CFTR 通道的 Cl^- 分泌缺陷导致 Na^+ 和水被上皮细胞重吸收，降低了气道表面液体的体积，增加了其黏性，并损害了液体的机械清除。依照 *CFTR* 基因的突变位点，阴离子转运可以达到不同程度的破坏。除了上面描述的气道感染，患有囊性纤维变性的病人可能有胰腺消化酶分泌不足、肠梗阻（intestinal obstruction）、不育（infertility）及通过汗腺的盐分损失增加。患有囊性纤维变性的病人大部分生来胰腺功能不足，导致消化不良和腹泻。由 CFTR 通道突变引发的碳酸氢盐和液体分泌的缺陷导致胰腺功能的丧失和渐进性胰腺组织破损。正在进行的研究包括有缺陷的 CFTR 或 ENaC 功能的药理学靶点，用来纠正囊性纤维变性病人的上皮转运。

参考文献

2.1 导言

综述

Hille, B., 2001. *Ion channels of excitable membranes.* Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.

Hille, B., Armstrong, C. M., and MacKinnon, R., 1999. Ion channels: from idea to reality. *Nat. Med.* v. 5 p. 1105–1109.

2.2 通道和载体是膜转运蛋白的主要类型

研究

Jentsch, T. J., Hübner, C. A., and Fuhrmann, J. C., 2004. Ion channels: Function unravelled by dysfunction. *Nat. Cell Biol.* v. 6 p. 1039–1047.

2.5 K⁺通道催化选择性和快速的离子渗透

综述

Berneche, S., and Roux, B., 2001. Energetics of ion conduction through the K+ channel. *Nature* v. 414 p. 73–77.

Choe, S., 2002. Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 3 p. 115–121.
Hille, B., Armstrong, C. M., and MacKinnon, R., 1999. Ion channels: from idea to reality. *Nat. Med.* v. 5 p. 1105–1109.
Miller, C., 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* v. 1 p. R0004–R0004.
Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., and MacKinnon, R., 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K+ selectivity filter. *Nature* v. 414 p. 37–42.

研究

Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. *Science* v. 280 p. 69–77.
Gutman, G. A., et al., 2003. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* v. 55 p. 583–586.
Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* v. 414 p. 43–48.

2.6 不同的K⁺通道用相似的门控耦联不同的激活或失活机制

综述

Choe, S., 2002. Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 3 p. 115–121.
Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* v. 417 p. 523–526.
Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R., 2003. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. *Nature* v. 423 p. 42–48.
Kullmann, D. M., Rea, R., Spauschus, A., and Jouvenceau, A., 2001. The inherited episodic ataxias: how well do we understand the disease mechanisms? *Neuroscientist* v. 7 p. 80–88.
Tristani-Firouzi, M., and Sanguinetti, M. C., 2003. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v. 35 p. 27–35.

研究

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* v. 417 p. 515–522.
Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R., 2005. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* v. 309 p. 903–908.
Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R., 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K+ channel. *Science* v. 309 p. 897–903.
Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* v. 414 p. 43–48.

2.7 电压依赖的Na⁺通道被膜去极化激活并转换电信号

综述

Hondeghem, L. M., and Katzung, B. G., 1977. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta* v. 472 p. 373–398.
Vilin, Y. Y., and Ruben, P. C., 2001. Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies. *Cell Biochem. Biophys.* v. 35 p. 171–190.
Yu, F. H., and Catterall, W. A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* v. 4 p. 207–207.

研究

Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M. T., Ranjan, R., Marban, E., and Tomaselli, G. F., 1996. Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na+ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron* v. 16 p. 1037–1047.
Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F., Scheuer, T., and Catterall, W. A., 1995. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* v. 83 p. 433–442.
Kellenberger, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A., 1996. Movement of the Na+ channel inactivation gate during inactivation. *J. Biol. Chem.* v. 271 p. 30971–30979.
Mitrovic, N., George, A. L., and Horn, R., 2000. Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. *J. Gen. Physiol.* v. 115 p. 707–718.
Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T., and Catterall, W. A., 1996. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 93 p. 9270–9275.
Rohl, C. A., Boeckman, F. A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W. A., and Klevit, R. E., 1999. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* v. 38 p. 855–861.
Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D.,

Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S., 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* v. 339 p. 597–603.

2.8 上皮Na⁺通道调节Na⁺的内稳态

综述

Kellenberger, S., and Schild, L., 2002. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* v. 82 p. 735–767.

研究

Bruns, J. B., Hu, B., Ahn, Y. J., Sheng, S., Hughey, R. P., and Kleyman, T. R., 2003. Multiple epithelial Na+ channel domains participate in subunit assembly. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 285 p. F600–F609.

Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., and Rossier, B. C., 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na+ channel is made of three homologous subunits. *Nature* v. 367 p. 463–467.

Chang, S. S., et al., 1996. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat. Genet.* v. 12 p. 248–253.

Hansson, J. H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B., and Lifton, R. P., 1995. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat. Genet.* v. 11 p. 76–82.

Palmer, L. G., and Andersen, O. S., 1989. Interactions of amiloride and small monovalent cations with the epithelial sodium channel. Inferences about the nature of the channel pore. *Biophys. J.* v. 55 p. 779–787.

Reif, M. C., Troutman, S. L., and Schafer, J. A., 1986. Sodium transport by rat cortical collecting tubule. Effects of vasopressin and desoxycorticosterone. *J. Clin. Invest.* v. 77 p. 1291–1298.

2.9 膜Ca^{2+}通道激活细胞内功能

综述

Carafoli, E., 2003. The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 4 p. 326–332.

Sather, W. A., and McCleskey, E. W., 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 65 p. 133–159.

研究

Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F., and Tsien, R. W., 1995. Ca^{2+} channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca^{2+} interactions. *Neuron* v. 15 p. 1121–1132.

Erickson, M. G., Liang, H., Mori, M. X., and Yue, D. T., 2003. FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca^{2+} channel CaM preassociation. *Neuron* v. 39 p. 97–107.

Hess, P., and Tsien, R. W., 1984. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* v. 309 p. 453–456.

Liang, H., DeMaria, C. D., Erickson, M. G., Mori, M. X., Alseikhan, B. A., and Yue, D. T., 2003. Unified mechanisms of Ca^{2+} regulation across the Ca^{2+} channel family. *Neuron* v. 39 p. 951–960.

Lipkind, G. M., and Fozzard, H. A., 2003. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca^{2+} channel. *Mol. Pharmacol.* v. 63 p. 499–511.

Serysheva, I. I., Ludtke, S. J., Baker, M. R., Chiu, W., and Hamilton, S. L., 2002. Structure of the voltage-gated L-type Ca^{2+} channel by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 99 p. 10370–10375.

Wu, X. S., Edwards, H. D., and Sather, W. A., 2000. Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated Ca^{2+} channel. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 31778–31785.

Yang, J., Ellinor, P. T., Sather, W. A., Zhang, J. F., and Tsien, R. W., 1993. Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature* v. 366 p. 158–161.

2.10 Cl^-通道有多种多样的生物学功能

综述

Bretag, A. H., 1987. Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.* v. 67 p. 618–724.

Ellison, D. H., 2000. Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 279 p. F616–F625.

Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A. A., 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* v. 82 p. 503–568.

研究

Accardi, A., and Miller, C., 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl^- channels. *Nature* v. 427 p. 803–807.

Birkenhäger, R., et al., 2001. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat. Genet.* v. 29 p. 310–314.

Dutzler, R., Campbell, E. B., and MacKinnon, R., 2003. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* v. 300 p. 108–112.

Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 2002. X-ray struc-

ture of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* v. 415 p. 287–294.

Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., and Jentsch, T. J., 1992. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* v. 257 p. 797–800.

Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., and Jentsch, T. J., 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* v. 104 p. 205–215.

Lloyd, S. E., et al., 1996. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* v. 379 p. 445–449.

Miller, C., and White, M. M., 1984. Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 2772–2775.

Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A., and Jentsch, T. J., 1995. Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* v. 373 p. 527–531.

Simon, D. B., et al., 1997. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* v. 17 p. 171–178.

2.11 水通道选择性转运水

综述

Lehmann, G. L., Gradilone, S. A., and Marinelli, R. A., 2004. Aquaporin water channels in central nervous system. *Curr. Neurovasc. Res.* v. 1 p. 293–303.

Nielsen, S., Frøkiaer, J., Marples, D., Kwon, T. H., Agre, P., and Knepper, M. A., 2002. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol. Rev.* v. 82 p. 205–244

Valenti, G., Procino, G., Tamma, G., Carmosino, M., and Svelto, M., 2005. Minireview: aquaporin 2 trafficking. *Endocrinology* v. 146 p. 5063–5070.

Verkman, A. S., 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* v. 118 p. 3225–3232.

研究

Deen, P. M., Verdijk, M. A., Knoers, N. V., Wieringa, B., Monnens, L. A., van Os, C. H., and van Oost, B. A., 1994. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* v. 264 p. 92–95.

Harries, W. E., Akhavan, D., Miercke, L. J., Khademi, S., and Stroud, R. M., 2004. The channel architecture of aquaporin-0 at a 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 101 p. 14045–14050.

Jung, J. S., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B., and Agre, P., 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* v. 269 p. 14648–14654.

King, L. S., Choi, M., Fernandez, P. C., Cartron, J. P., and Agre, P., 2001. Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N. Engl. J. Med.* v. 345 p. 175–179.

Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y., 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* v. 407 p. 599–605.

Smith, B. L., and Agre, P., 1991. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J. Biol. Chem.* v. 266 p. 6407–6415.

Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., and Jap, B. K., 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* v. 414 p. 872–878.

Zeidel, M. L., Ambudkar, S. V., Smith, B. L., and Agre, P., 1992. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* v. 31 p. 7436–7440.

2.12 动作电位是依赖多种离子通道的电信号

综述

Carmeliet, E., 2004. Intracellular Ca(2+) concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. *Cell Calcium* v. 35 p. 557–573.

Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C., 2001. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* v. 104 p. 569–580.

Nichols, C. G., and Lopatin, A. N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 59 p. 171–191.

Sah, R., Ramirez, R. J., Oudit, G. Y., Gidrewicz, D., Trivieri, M. G., Zobel, C., and Backx, P. H., 2003. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (I_{to}). *J. Physiol.* v. 546 p. 5–18.

研究

Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N., and George, A. L., 1995. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* v. 376 p. 683–685.

Chen, Q., et al., 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* v. 392 p. 293–296.

Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., and Keating, M. T., 1995. A molecular basis for cardiac ar-

rhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* v. 80 p. 795–803.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* v. 117 p. 500–544.

Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., 1952. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 140 p. 177–183.

Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., 1952. Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* v. 17 p. 43–52.

Lossin, C., Wang, D. W., Rhodes, T. H., Vanoye, C. G., and George, A. L., 2002. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* v. 34 p. 877–884.

Schott, J. J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T. M., Hulsbeek, M., Wilde, A. A., Escande, D., Mannens, M. M., and Le Marec, H., 1999. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat. Genet.* v. 23 p. 20–21.

Splawski, I., et al., 2004. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* v. 119 p. 19–31.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A., and Keating, M. T., 1995. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* v. 80 p. 805–811.

2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌

综述

Berchtold, M. W., Brinkmeier, H., and Müntener, M., 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol. Rev.* v. 80 p. 1215–1265.

Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 4 p. 517–529.

Bers, D. M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* v. 415 p. 198–205.

da Fonseca, P. C., Morris, S. A., Nerou, E. P., Taylor, C. W., and Morris, E. P., 2003. Domain organization of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor as revealed by single-particle analysis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 100 p. 3936–3941.

Rizzuto, R., and Pozzan, T., 2006. Microdomains of intracellular Ca^{2+}: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* v. 86 p. 369–408.

Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., and Marks, A. R., 2005. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 69–98.

研究

Campbell, K. P., Knudson, C. M., Imagawa, T., Leung, A. T., Sutko, J. L., Kahl, S. D., Raab, C. R., and Madson, L., 1987. Identification and characterization of the high affinity [^{3}H]ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* v. 262 p. 6460–6463.

Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., Reiken, S., Warrier, S., Belevych, A. E., Harvey, R. D., Richter, W., Jin, S. L., Conti, M., and Marks, A. R., 2005. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* v. 123 p. 25–35.

Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblit, N., and Marks, A. R., 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* v. 101 p. 365–376.

Sharma, M. R., Penczek, P., Grassucci, R., Xin, H. B., Fleischer, S., and Wagenknecht, T., 1998. Cryoelectron microscopy and image analysis of the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* v. 273 p. 18429–18434.

Tanabe, T., Beam, K. G., Adams, B. A., Niidome, T., and Numa, S., 1990. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* v. 346 p. 567–569.

Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., Deng, S. X., Vest, J. A., Cervantes, D., Coromilas, J., Landry, D. W., and Marks, A. R., 2004. Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* v. 304 p. 292–296.

Wehrens, X. H. et al., 2003. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* v. 113 p. 829–840.

2.14 一些葡萄糖转运蛋白是单向转运体

综述

Devaskar, S. U., and Mueckler, M. M., 1992. The mammalian glucose transporters. *Pediatr. Res.* v. 31 p. 1–13.

Kahn, B. B., 1992. Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J. Clin. Invest.* v. 89 p. 1367–1374.

Saier, M. H., 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* v. 35 p. 699–710.

Vannucci, S. J., Maher, F., and Simpson, I. A., 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* v. 21 p. 2–21.

研究

Heilig, C. W., Saunders, T., Brosius, F. C., Moley, K., Heilig, K., Baggs, R., Guo, L., and Conner, D., 2003. Glucose transporter-1-deficient mice exhibit impaired development and deformities that are similar to diabetic embryopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 100 p. 15613–15618.

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., and Lodish, H. F., 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* v. 229 p. 941–945.

Mueckler, M., and Makepeace, C., 2004. Analysis of transmembrane segment 8 of the GLUT1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility. *J. Biol. Chem.* v. 279 p. 10494–10499.

Seidner, G., Alvarez, M. G., Yeh, J. I., O'Driscoll, K. R., Klepper, J., Stump, T. S., Wang, D., Spinner, N. B., Birnbaum, M. J., and De Vivo, D. C., 1998. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat. Genet.* v. 18 p. 188–191.

Shigematsu, S., Watson, R. T., Khan, A. H., and Pessin, J. E., 2003. The adipocyte plasma membrane caveolin functional/structural organization is necessary for the efficient endocytosis of GLUT4. *J. Biol. Chem.* v. 278 p. 10683–10690.

2.15 同向转运体和反向转运体介导耦联转运

综述

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Iwata, S., and Kaback, H. R., 2003. The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett.* v. 555 p. 96–101.

Kaback, H. R., Sahin-Tóth, M., and Weinglass, A. B., 2001. The kamikaze approach to membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 610–620.

研究

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S., 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* v. 301 p. 610–615.

Huang, Y., Lemieux, M. J., Song, J., Auer, M., and Wang, D. N., 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* v. 301 p. 616–620.

Jardetzky, O., 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* v. 211 p. 969–970.

2.16 跨膜的Na^+梯度对于很多转运体的功能是必需的

综述

Blaustein, M. P., and Lederer, W. J., 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* v. 79 p. 763–854.

Ellison, D. H., 2000. Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 279 p. F616–F625.

Kaplan, M. R., Mount, D. B., and Delpire, E., 1996. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu. Rev. Physiol.* v. 58 p. 649–668.

Rasgado-Flores, H., and Gonzalez-Serratos, H., 2000. Plasmalemmal transport of magnesium in excitable cells. *Front. Biosci.* v. 5 p. D866–D879.

Webel, R., Haug-Collet, K., Pearson, B., Szerencsei, R. T., Winkfein, R. J., Schnetkamp, P. P., and Colley, N. J., 2002. Potassium-dependent sodium-calcium exchange through the eye of the fly. *Ann. N Y Acad. Sci.* v. 976 p. 300–314.

研究

Haug-Collet, K., Pearson, B., Webel, R., Szerencsei, R. T., Winkfein, R. J., Schnetkamp, P. P., and Colley, N. J., 1999. Cloning and characterization of a potassium-dependent sodium/calcium exchanger in Drosophila. *J. Cell Biol.* v. 147 p. 659–670.

Nicoll, D. A., Ottolia, M., Lu, L., Lu, Y., and Philipson, K. D., 1999. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na^+-Ca^{2+} exchanger. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 910–917.

Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A., and Lifton, R. P., 1996. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat. Genet.* v. 13 p. 183–188.

Simon, D. B., Karet, F. E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J. H., DiPietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S. A., and Lifton, R. P., 1996. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K^+ channel, ROMK. *Nat. Genet.* v. 14 p. 152–156.

Simon, D. B., et al., 1997. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* v. 17 p. 171–178.

Simon, D. B., et al., 1996. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat. Genet.* v. 12 p. 24–30.

2.17 一些Na^+转运体调节细胞内或细胞外pH

综述

Bobulescu, I. A., Di Sole, F., and Moe, O. W., 2005. Na^+/H^+ exchangers: physiology and link to hypertension and organ ischemia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* v. 14 p. 485–494.

Fliegel, L., and Karmazyn, M., 2004. The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors. *Biochem. Cell Biol.* v. 82 p. 626–635.

Gross, E., and Kurtz, I., 2002. Structural determinants and significance of regulation of electrogenic Na^+-HCO_3^- cotransporter stoichiometry. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 283 p. F876–F887.

Wakabayashi, S., Shigekawa, M., and Pouyssegur, J., 1997. Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *Physiol. Rev.* v. 77 p. 51–74.

Zachos, N. C., Tse, M., and Donowitz, M., 2005. Molecular physiology of intestinal Na^+/H^+ exchange. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 411–443.

研究

Akiba, Y., Furukawa, O., Guth, P. H., Engel, E., Nastaskin, I., Sassani, P., Dukkipatis, R., Pushkin, A., Kurtz, I., and Kaunitz, J. D., 2001. Cellular bicarbonate protects rat duodenal mucosa from acid-induced injury. *J. Clin. Invest.* v. 108 p. 1807–1816.

Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., and Michel, H., 2005. Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* v. 435 p. 1197–1202.

Orlowski, J. and Grinstein, S., 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* v. 447 p. 549–565.

Williams, K. A., 2000. Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* v. 403 p. 112–115.

2.18 Ca^{2+}-ATPase把Ca^{2+}泵进细胞内的储存隔室中

综述

Belke, D. D., and Dillmann, W. H., 2004. Altered cardiac calcium handling in diabetes. *Curr. Hypertens. Rep.* v. 6 p. 424–429.

Green, N. M., and MacLennan, D. H., 2002. Calcium callisthenics. *Nature* v. 418 p. 598–599.

Kühlbrandt, W., 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 282–295.

Laporte, R., Hui, A., and Laher, I., 2004. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* v. 56 p. 439–513.

Stokes, D. L., and Green, N. M., 2003. Structure and function of the calcium pump. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 32 p. 445–468.

Strehler, E. E., and Treiman, M., 2004. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr. Mol. Med.* v. 4 p. 323–335.

Sweadner, K. J., and Donnet, C., 2001. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* v. 356 p. 685–704.

Verkhratsky, A., 2004. Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells. *Biol. Res.* v. 37 p. 693–699.

研究

Sørensen, T. L., Møller, J. V., and Nissen, P., 2004. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* v. 304 p. 1672–1675.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H., 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* v. 405 p. 647–655.

Toyoshima, C., and Nomura, H., 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* v. 418 p. 605–611.

2.19 Na^+/K^+-ATPase维持质膜的Na^+和K^+梯度

综述

Glitsch, H. G., 2001. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol. Rev.* v. 81 p. 1791–1826.

Horisberger, J. D., 2004. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)* v. 19 p. 377–387.

Kühlbrandt, W., 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 282–295.

Rakowski, R. F., and Sagar, S., 2003. Found: Na^+ and K^+ binding sites of the sodium pump. *News Physiol. Sci.* v. 18 p. 164–168.

Sweadner, K. J., and Donnet, C., 2001. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* v. 356 p. 685–704.

研究

Hilge, M., Siegal, G., Vuister, G. W., Güntert, P., Gloor, S. M., and Abrahams, J. P., 2003. ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat. Struct. Biol.* v. 10 p. 468–474.

Rice, W. J., Young, H. S., Martin, D. W., Sachs, J. R., and Stokes, D. L., 2001. Structure of Na^+,K^+-ATPase at 11-Å resolution: comparison with Ca^{2+}-ATPase in E_1 and E_2 states. *Biophys. J.* v. 80 p. 2187–2197.

Toyoshima, C., and Nomura, H., 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* v. 418 p. 605–611.

2.20 F_1F_0-ATP合酶将 H^+ 运动与 ATP 合成或水解耦联

综述

Senior, A. E., Nadanaciva, S., and Weber, J., 2002. The molecular mechanism of ATP synthesis by F_1F_0-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1553 p. 188–211.

研究

Bernal, R. A. and Stock, D., 2004. Three-dimensional structure of the intact *Thermus thermophilus* H+-ATPase/synthase by electron microscopy. *Structure (Camb)* v. 12 p. 1789–1798.

Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K., 2004. Mechanically driven ATP synthesis by F_1-ATPase. *Nature* v. 427 p. 465–468.

Senior, A. E. and Weber, J., 2004. Happy motoring with ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* v. 11 p. 110–112.

Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E., 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* v. 286 p. 1700–1705.

2.21 H^+-ATPase把质子转运出细胞质

综述

Bajjalieh, S., 2005. A new view of an old pore. *Cell* v. 121 p. 496–497.

Brown, D., and Breton, S., 2000. H(+)V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. *J. Exp. Biol.* v. 203 p. 137–145.

Fillingame, R. H., Jiang, W., and Dmitriev, O. Y., 2000. Coupling H(+) transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor. *J. Exp. Biol.* v. 203 Pt 1 p. 9–17.

Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W. R., and Müller, V., 2001. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* v. 204 p. 2597–2605.

Karet, F. E., 2002. Monogenic tubular salt and acid transporter disorders. *J. Nephrol.* v. 15 Suppl 6 p. S57–S68.

Nishi, T., and Forgac, M., 2002. The vacuolar (H+)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 94–103.

Stevens, T. H., and Forgac, M., 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 779–808.

Vik, S. B., Long, J. C., Wada, T., and Zhang, D., 2000. A model for the structure of subunit a of the Escherichia coli ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1458 p. 457–466.

研究

Arai, H., Terres, G., Pink, S., and Forgac, M., 1988. Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* v. 263 p. 8796–8802.

Kane, P. M., 1995. Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H+-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* v. 270 p. 17025–17032.

Smith, A. N., Lovering, R. C., Futai, M., Takeda, J., Brown, D., and Karet, F. E., 2003. Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H+-ATPase subunit genes. *Mol. Cell* v. 12 p. 801–803.

Vasilyeva, E., Liu, Q., MacLeod, K. J., Baleja, J. D., and Forgac, M., 2000. Cysteine scanning mutagenesis of the noncatalytic nucleotide binding site of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 255–260.

Wilkens, S., Vasilyeva, E., and Forgac, M., 1999. Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 31804–31810.

2.22 展望

综述

Multiple authors, 2004. The state of ion channel research in 2004. *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 3 p. 239–278.

2.25 补充：大部分K^+通道都经历整流

综述

Ashcroft, F. M., 1988. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 11 p. 97–118.

Ashcroft, F. M., and Gribble, F. M., 1999. ATP-sensitive K+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* v. 42 p. 903–919.

Bichet, D., Haass, F. A., and Jan, L. Y., 2003. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K+ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 4 p. 957–967.

Campbell, J. D., Sansom, M. S., and Ashcroft, F. M., 2003. Potassium channel regulation. *EMBO Rep.* v. 4 p. 1038–1042.

Dhamoon, A. S., and Jalife, J., 2005. The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* v. 2 p. 316–324.

Lu, Z., 2004. Mechanism of rectification in inward-rectifier K^+ channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 66 p. 103–129.

Nichols, C. G., and Lopatin, A. N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 59 p. 171–191.

研究

Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T.,

Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A., 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* v. 300 p. 1922–1926.

Liu, Y., Jurman, M. E., and Yellen, G., 1996. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K+ channel during gating. *Neuron* v. 16 p. 859–867.

Reimann, F., Huopio, H., Dabrowski, M., Proks, P., Gribble, F. M., Laakso, M., Otonkoski, T., and Ashcroft, F. M., 2003. Characterisation of new K_{ATP}-channel mutations associated with congenital hyperinsulinism in the Finnish population. *Diabetologia* v. 46 p. 241–249.

2.26 补充：阴离子通道的突变引起囊性纤维变性

综述

Higgins, C. F., 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Res. Microbiol.* v. 152 p. 205–210.

Riordan, J. R., 2005. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 701–718.

Sheppard, D. N., and Welsh, M. J., 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* v. 79 p. S23–S45.

Slieker, M. G., Sanders, E. A., Rijkers, G. T., Ruven, H. J., and van der Ent, C. K., 2005. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* v. 4 Suppl 2 p. 7–13.

Steward, M. C., Ishiguro, H., and Case, R. M., 2005. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 377–409.

研究

Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M., and Riordan, J. R., 1992. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* v. 68 p. 809–818.

Bishop, L., Agbayani, R., Ambudkar, S. V., Maloney, P. C., and Ames, G. F., 1989. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 86 p. 6953–6957.

Chang, G., and Roth, C. B., 2001. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* v. 293 p. 1793–1800.

Knowles, M. R., Stutts, M. J., Spock, A., Fischer, N., Gatzy, J. T., and Boucher, R. C., 1983. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* v. 221 p. 1067–1070.

Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K., and Boucher, R. C., 2004. Increased airway epithelial Na^+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat. Med.* v. 10 p. 487–493.

Quinton, P. M., 1983. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* v. 301 p. 421–422.

Randak, C., and Welsh, M. J., 2003. An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR. *Cell* v. 115 p. 837–850.

Reddy, M. M., Light, M. J., and Quinton, P. M., 1999. Activation of the epithelial Na^+ channel (ENaC) requires CFTR Cl^- channel function. *Nature* v. 402 p. 301–304.

Reddy, M. M., and Quinton, P. M., 2003. Control of dynamic CFTR selectivity by glutamate and ATP in epithelial cells. *Nature* v. 423 p. 756–760.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., and Chou, J. L., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* v. 245 p. 1066–1073.

Wang, X. F., et al., 2003. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat. Cell Biol.* v. 5 p. 902–906.

连慕兰　译

第3章 蛋白质的膜定向转移

D. Thomas Rotkowski
Howard Hughes Medical Institute，University of Michigan Medical Center
Vishwanath R. Lingappa
California Pacific Medical Center Research Institute

本章概要

3.1 导言

关键概念

- 细胞必须将蛋白质定位到特定的细胞器和膜上。
- 蛋白质被从胞质溶胶直接运送到某些种类的细胞器中。
- 内质网（ER）是蛋白质进入分泌途径的切入点，它是高度特化的。
- 一些其他细胞器和质膜通过分泌途径接受所需要的蛋白质。

细胞与外部环境相互作用及应答的能力对细胞的生存和行使功能来说是很关键的。多细胞真核生物体内的胞外环境充满了养分、生长因子、激素，以及其他可以指导细胞进行增殖、分化或遭受程序性死亡的分子。如果细胞要对胞外环境作出适当的反应就必须感知到这些胞外信息。同样，细胞也改变环境使其有益于自身：而细胞能够分泌构建或分解胞外基质的蛋白质；还可以通过直接接触将信号传递到邻近的细胞；在多细胞有机体中，一些细胞如内分泌细胞可以分泌激素来影响远距离的其他细胞的活性。

分泌性蛋白和跨膜蛋白是细胞与其环境相互作用的主要工具。从最简单的细菌到高度分化和特化的哺乳动物细胞，每一个细胞都为此合成分泌性蛋白和跨膜蛋白。分泌性蛋白被释放到胞外环境，而跨膜蛋白则横跨细胞质膜，蛋白质的一部分暴露于细胞外，还有一部分留在细胞里面。要指引蛋白质整个或部分跨过质膜，对于细胞尚存在一个问

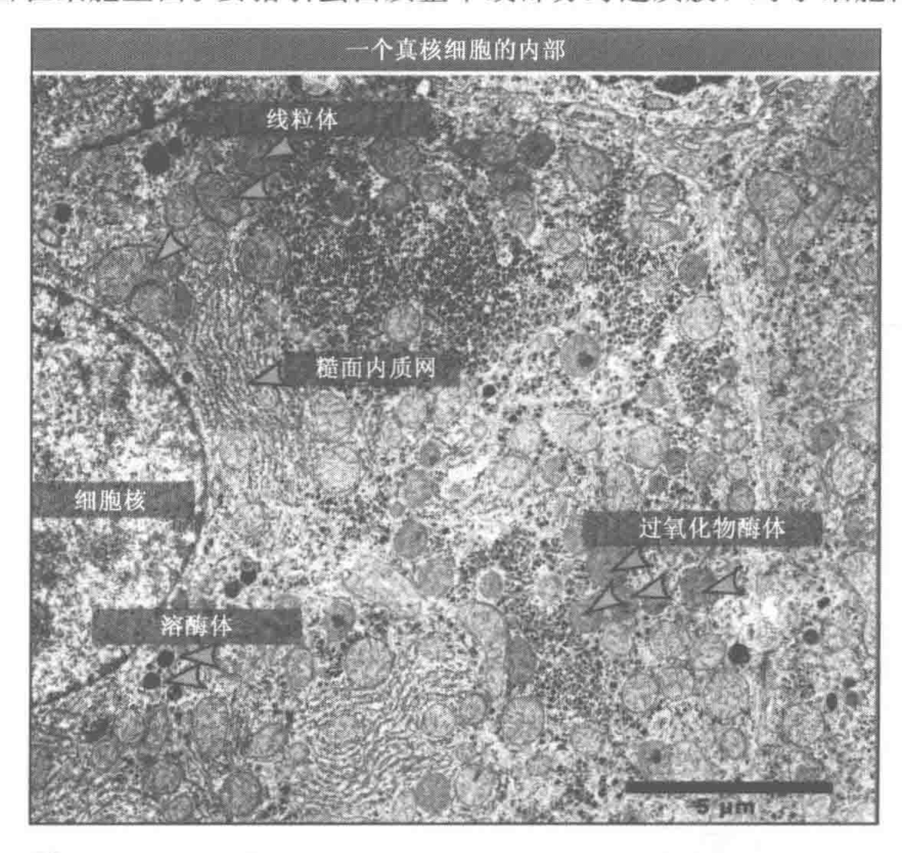


图 3.1 一个肝细胞内部的电子显微镜照片。该照片显示了真核细胞中膜性细胞器的种类和密度。图中可以看到细胞核、线粒体、溶酶体、过氧化物酶体和粗面内质网。照片由 Daniel S. Friend 惠赠。

题。细胞的蛋白质由核糖体在胞质溶胶中合成。所以，一定有某种机制能选择性地将分泌性蛋白和跨膜蛋白而不是其他物质运送到质膜。在细菌中，这种选择性转运仅涉及细胞要在预定到质膜和不到质膜的蛋白质之间制造一种区别，而在真核生物中，这一问题是复合的（compound）。典型的原核生物有质膜，但细胞内部没有细胞器，而真核细胞有很多膜性结构，包括细胞核（nucleus）、线粒体（mitochondria）、叶绿体（chloroplast）（植物细胞中）、过氧化物酶体（peroxisome）、内质网（endoplasmic reticulum，ER）、高尔基体（Golgi apparatu）以及溶酶体（lysosome），如图 3.1 所示。

每一种细胞器都含有独有的蛋白质组分，故除了恰当地定位分泌性蛋白和跨膜蛋白之外，真核细胞还必须准确地分选（sort）这些细胞器的蛋白质。在典型的真核细胞中，细胞器大约占据一半的细胞空间，这意味着在任何时候，大部分合成的蛋白质必须被选择性地定位到这些细胞器之一。

蛋白质是如何定位到细胞器上的呢？总地来说，细胞用靶向信号（targeting signal）——蛋白质一级结构中不连续的一段氨基酸——将蛋白质引导至特定的细胞器。靶向信号的性质决定了蛋白质将要到达的细胞器，那些细胞器有蛋白装置（protein machinery），能特异地识别到达该细胞器的蛋白质上的恰当信号。如果合成的蛋白质中没有靶向信号，该蛋白质合成之后就会留在细胞液中。

对于某些细胞器（线粒体、叶绿体、细胞核及过氧化物酶体），一旦蛋白质被核糖体翻译完成就会被运离细胞液。但是，对于另一些细胞器（内质网、高尔基体、溶酶体还有质膜），蛋白质的定位过程更为复杂。这些细胞器和通过这些细胞器的蛋白质运输合在一起归属于**分泌途径（secretory pathway）**。高尔基体、溶酶体还有质膜，蛋白质并不能直接到达这些部位，而是如图 3.2 所示，所有注定要到达这些膜性结构的任何一个蛋白质或将被分泌出去的蛋白质，首先要被运送到内质网膜上并且穿越内质网膜。在内质网中，这些蛋白质折叠成正确的三维结构，在许多情况下，经共价修饰并与其他蛋白质组装成复合物，然后首先被转运到高尔基体，从这里前行到达它们的最终目的地——或返回到内质网中，或继续向前到达溶酶体或质膜。分泌途径中，蛋白质在细胞器之间的运输是通过小泡（vesicle，膜泡）进行的，小泡从原来细胞器的膜上出芽脱离下来然后与目的

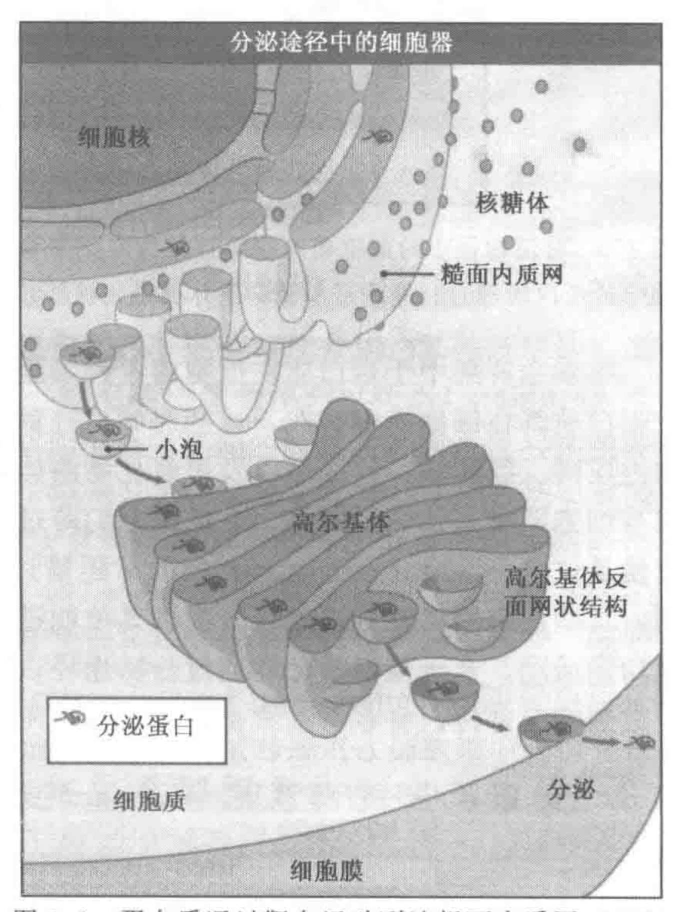


图 3.2 蛋白质通过靶向运动到达粗面内质网（rER）膜和穿过粗面内质网膜易位而进入分泌途径。在折叠和修饰之后，这些蛋白质离开 ER 进入将要到 Golgi 体的小泡中。大多数蛋白质经由分泌小泡从 Golgi 体行进到细胞表面。

细胞器的膜融合，释放包在其中的蛋白质。

分泌途径有一个重要的特征，就是这些细胞器**内腔（lumen）**的环境在许多方面与细胞外部环境相似［细胞器被认为是由特化为专门分泌蛋白质的细胞膜内陷演化而来，分泌性蛋白被“拧下”（pinched off）进入胞内的小泡］。照此，最终必须被分泌出去的蛋白质将能够在细胞内折叠，但是进行折叠是在一个与这些蛋白质最终将去的地方相类似的环境中（译者注：与细胞外相似的环境，即内质网腔），如图 3.3 所示。

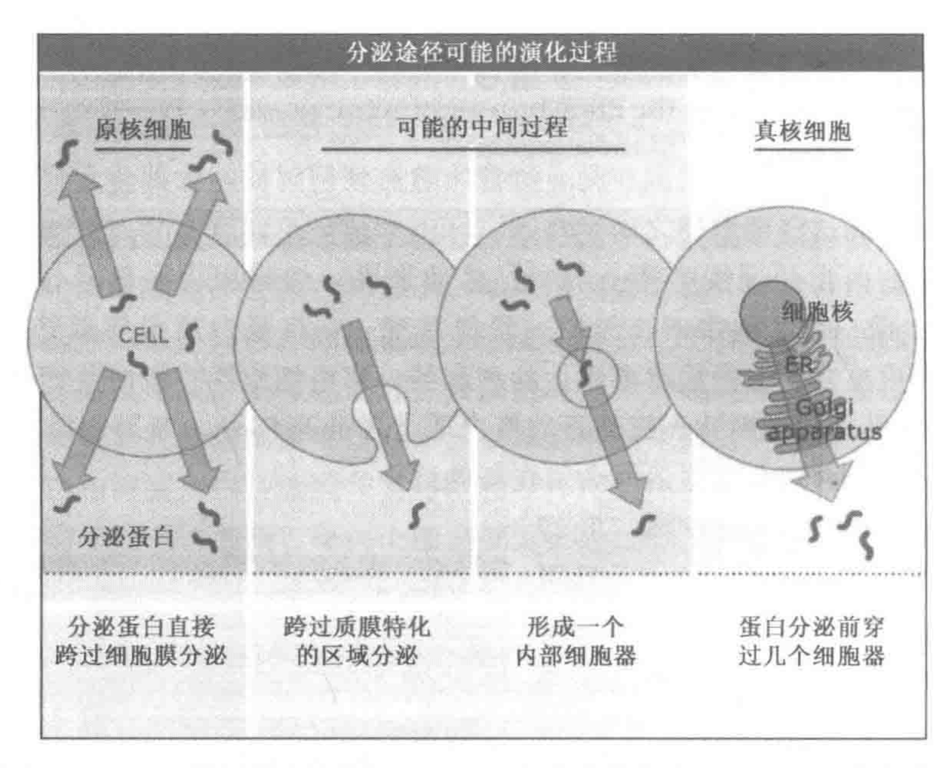


图 3.3　分泌途径中的细胞器可能由特化为专用于蛋白质分泌的质膜区段内化并演进而来。真核细胞中的蛋白质没有直接跨过质膜分泌，而是先被转移到 ER 腔中，这里的环境与细胞外的环境相似。

本章主要集中于蛋白质在细胞内各种细胞器和膜之中定位的起始事件。由于几乎所有蛋白质都在细胞液中合成，这些起始事件都发生在直接输入蛋白质的细胞器的膜上，如内质网、线粒体、叶绿体以及过氧化物酶体膜。细胞器必须正确区分所需输入的蛋白质与细胞液中其他的蛋白质，并运送它们跨过细胞器膜或进入膜内，这一过程被称为**蛋白质易位（protein translocation）**。本章还描述了内质网在准备蛋白质中发挥的特殊作用，这些蛋白质将经分泌途径分配到其他能进去的部位，还描述了内质网进行的各种其他功能活动。至于蛋白质怎样通过分泌途径，以及怎样在高尔基体内分选以便将蛋白质投放到特定部位，将在第 4 章蛋白质在膜之间的运输中讨论。

3.2　蛋白质穿过内质网膜易位进入分泌途径（概述）

关键概念

- 信号序列指引新生的分泌性蛋白和膜蛋白到达内质网进行易位。
- 蛋白质通过一种水性门控通道穿过内质网膜。
- 分泌性蛋白转移时完全穿过内质网膜，跨膜蛋白则整合到内质网膜中。
- 蛋白质在离开内质网之前都会通过酶和蛋白伴侣进行修饰和折叠。

细胞在引导**新生蛋白**（**nascent proteins**）（那些刚刚开始合成的蛋白质）进入分泌途径时要经历许多挑战，如图 3.4 所示。首先，这些蛋白质必须被选择性识别并被带到它们在内质网膜上的易位位点，这一过程被称为**蛋白质的靶向运输**（**protein targeting**）。下一步，蛋白质必须完全（可溶性蛋白）或部分（膜蛋白）穿过内质网膜易位。在这一过程发生时必须阻止内质网腔和细胞液之间其他分子的普通交换。最后，在内质网腔中，所有已经易位的蛋白质必须正确折叠，许多情况下蛋白质还要受到修饰或与其他蛋白质聚集组装。本节对这些过程做了概述。

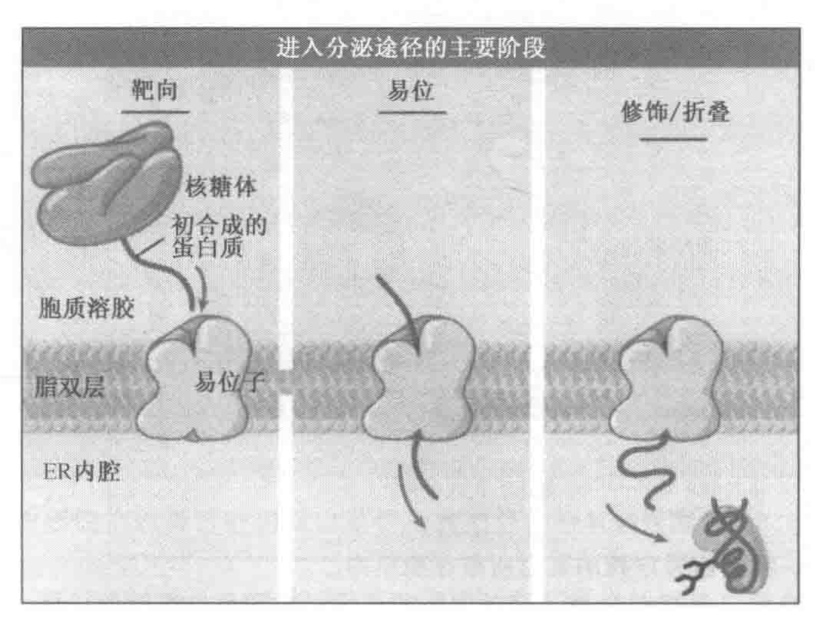


图 3.4 新生的分泌性蛋白或膜蛋白在内质网上经历的三个主要事件是 1）靶向（targeting），2）易位，3）折叠和修饰。

内质网只是进行靶向运输的膜性细胞器之一。其他细胞器还包括线粒体、叶绿体、过氧化物酶体和细胞核。指定到达 ER 的蛋白质必须能够与预备到达其他细胞器的蛋白质或预定留在细胞液中的蛋白质区别开来。细胞利用**信号序列**（**signal sequence**）来使这些蛋白质分开。信号序列是蛋白质一级结构中分立延伸的氨基酸序列，这些序列能够被靶细胞器上连结的装置所识别。如图 3.5 所示，与邮政编码按照目的地分选包裹的方法一样，信号序列指导分选蛋白质使其到达目的细胞器，每种细胞器使用不同的信号序列。

预定到内质网的蛋白质的信号序列被识别的机制影响着蛋白质易位的方式。最常见的易位进入内质网的形式是**共翻译易位**（**cotranslational translocation**），即蛋白质正在由结合于内质网膜上的核糖体合成时，易位就发生。当信号序列在细胞液中被**信号识别颗粒**（**signal recognition particle，SRP**）复合物识别时，这种形式的易位就开始了。SRP 结合到信号序列上，通过与内质网膜上的 SRP 受体（一个与 SRP 特异地结合的蛋白质）相互作用，将正在进行合成的蛋白质及核糖体带到内质网膜上。然而，某些 ER 信号序列并不与 SRP 相互作用。致使这些蛋白质以**翻译后**（**posttranslationally**）的方式易位，即蛋白质在细胞液中完成合成之后才进行易位。不同的有机体不同程度地使用这两种易位方式。哺乳动物中，几乎所有的易位都是共翻译易位，但是在更简单的真核生物如酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中，两种易位形式都会被用到。

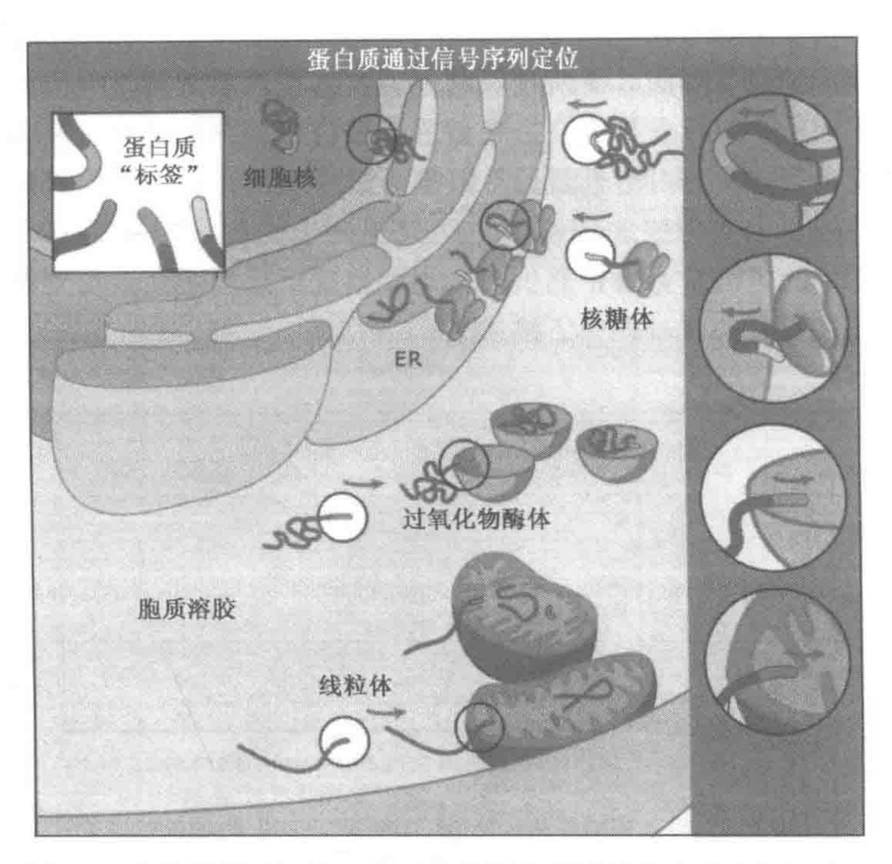


图 3.5 细胞器特异性信号序列使得蛋白质能够精确地在细胞中分布。没有信号序列的蛋白质留在胞质中。

当一个蛋白质已定向到达内质网，它必须要越过包围细胞器的脂双层。这需通过跨疏水性膜的水性通道进行。这些组成通道的蛋白质和与通道结合的的蛋白质合起来称作**易位子（translocon）**，作为一个完整的单位去加强它们的功能。这种通道是门控的，只有在新生蛋白质进行易位时才打开。门控防止了其他物质如小分子、离子和其他蛋白质通过，并且使细胞液和内质网内部各自保持为不同的隔室。

那么门控作用是如何实现的？新生肽链的信号序列与通道相互作用，这使通道的构象发生改变，通道打开，接着肽链插入到通道孔中。如图 3.6 所示，识别过程保障只在对易位底物的寻靶做出应答时通道才会打开，而不会对错误到达内质网膜上的细胞液的蛋白质做出应答而打开通道。重要的是，通道开启的大小似乎仅仅允许未折叠的伸展肽链通过，与此同时没有其他分子能通过。因为通道受到新生多肽链自身的门控，通道一直保持关闭，只有被肽链占据时才会打开，所以内质网膜提供的透过屏障得以保持。

当易位开始时，新生跨膜蛋白必须与那些需要整个穿过通道的蛋白质相区别。这种区别与对信号序列的识别一样，是由通道来完成的。有的蛋白质含有**跨膜结构域（transmembrane domain）**，这是一个注定要留在膜中的疏水片段。当正在转移的蛋白质中的跨膜结构域被易位子识别后，蛋白质的移动就会停止，后来跨膜结构域会被移出孔道而进入脂双层。在一条单肽链中这一过程能发生多次，帮助产生了大的多次跨膜蛋白的复杂结构（见 3.10 跨膜蛋白穿出易位通道进入膜双层脂中）。

对分泌性蛋白和跨膜蛋白来说，易位也与修饰多肽的活动相协调。例如，在易位的早期大多数信号序列就会被切除。许多易位的蛋白质上还有复杂的糖基化。靠近易位蛋

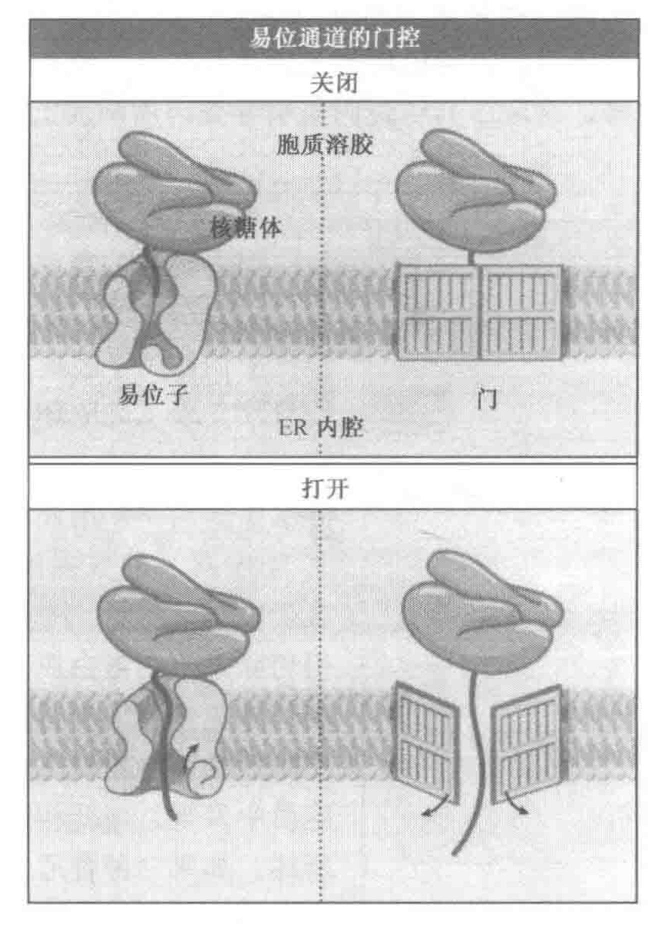


图 3.6 易位子通道的功能像一扇平时关闭的门，在待转移蛋白质存在的情况下才打开。“门”打开的宽度仅足以允许肽链穿过。

白质末端的其他部分被切割并共价结合到磷脂上。

最终每个易位后的蛋白质都必须折叠。新生蛋白质的折叠过程受到内质网中一些蛋白质的协助。其中一些被称为“伴侣”分子（**chaperone，蛋白伴侣**），这些蛋白质结合到新生蛋白质上，并且保护新生蛋白质不会错误折叠或发生聚集；其他一些蛋白质重构新生蛋白质上的二硫键或者协助装配多聚体蛋白质。所有这些蛋白质一起形成了一个**质量控制（quality control）**系统，它保证了内质网中蛋白质的正确折叠和装配。与质量控制系统紧密配合的是**逆行易位（retrograde translocation）**系统，这一系统确定错误折叠的蛋白质并且将其运回细胞液中进行降解。只有质量控制系统中所有步骤都达到要求，分泌性蛋白和膜蛋白才能够离开内质网并经由分泌途径到达它们的最终目的地。

3.3 蛋白质使用信号序列定向到内质网来进行易位

关键概念

- 蛋白质通过 N 端的一小段氨基酸信号序列定向到达内质网。
- 所有信号序列的唯一共同特征是在中间的一段疏水核心区，这一区域通常保证了任何相关蛋白质的易位。

所有核基因编码的蛋白质都是在胞质溶胶中开始它们的生物发生的。易位蛋白要穿

越内质网膜遇到的第一个挑战就是定向运动（targeting，靶向运动）：将分泌性蛋白和膜蛋白，而不是胞质溶胶蛋白，带到内质网上的易位位点。细胞通常利用新生蛋白质上的一段序列完成这一选择，这段序列将蛋白质引导到内质网膜上并且常常在蛋白质定位后被切除。

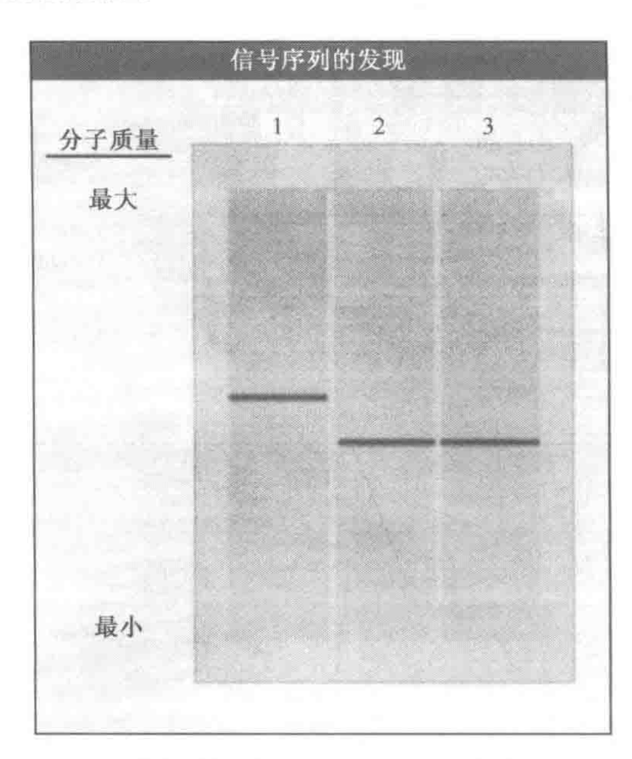


图 3.7　信号序列被发现的过程。当在无细胞体系中合成分泌性蛋白时，发现这些蛋白质比细胞中合成的（条带 2）大一些，因此在凝胶电泳中迁移更慢（条带 1）。如果蛋白质在有纯化的 ER 存在的体外系统中合成，制造出的蛋白质会小些（条带 3），并且发现它们已经穿过纯化的 ER 的膜易位。

蛋白质可能通过其中一段氨基酸序列而定向到内质网的想法被称为信号假说（signal hypothesis），这一假说是在 20 世纪 70 年代中期的一个经典实验中提出来的，该实验首次发现了细胞如何指导蛋白质到达特定隔室（compartment）的证据。该实验证明，分泌性蛋白是在胞质溶胶中开始合成的，在其 N 端有一段氨基酸序列。这段序列只有在蛋白质结合到内质网上以后才会被切除，但切除发生在蛋白质合成完成之前。该序列的切除显然伴随着蛋白质的跨膜移动，因为切除后的蛋白质只在内质网内发现而没有在胞质中发现。与此相对照，如图 3.7 中实验所述，如果一种普通的分泌性蛋白在没有内质网的体外实验中合成，则上述的延伸片段就不会被切除。这样，信号假说就提出，该延伸片段使新生蛋白质靶向运动到内质网上，并在蛋白质开始易位之后被切除。该假说预测这种延伸片段可能存在于所有的分泌性蛋白和膜蛋白上，但不存在于胞质溶胶蛋白上。总的来说，这个假说已经被证明是对的。这种独特的氨基酸片段，即如今所谓的信号序列，确实是引导分泌性蛋白和膜蛋白定向的一种普遍机制。在大多数情况下，这些序列被从**前蛋白（preprotein）**上切除，从而产生继续经历分泌途径的**成熟蛋白（mature protein）**。

信号序列最令人惊奇的特征是它们的多样性。这些序列唯一的共同元件是 6～20 个疏水氨基酸组成的中心区段（central segment），但是蛋白质与蛋白质之间并没有共同的特定序列。大多数信号序列在其 N 端还含有一些极性氨基酸。疏水结构域后面一般都有一段极性氨基酸组成的 C 端区域，在这里发生信号序列的切除。然而，这些极性区域都不是蛋白质定向所需要的。

如图 3.8 所示，鉴于上面描述的特点，可以作为功能信号序列的氨基酸序列范围很广。尽管信号序列具有多样性，在引导蛋白质到内质网并且使它们易位的能力上，信号序列或多或少是可以互换的。一个蛋白质的信号序列常常可以被另一个蛋白质的信号序列所取代，并不影响引导蛋白质定向和易位的能力。相似的，将信号序列连接到普通的胞质溶胶蛋白上会导致蛋白质易位。这样一段看起来并不特殊的序列能负责蛋白质靶向

运动的特异性，这真是令人惊讶。

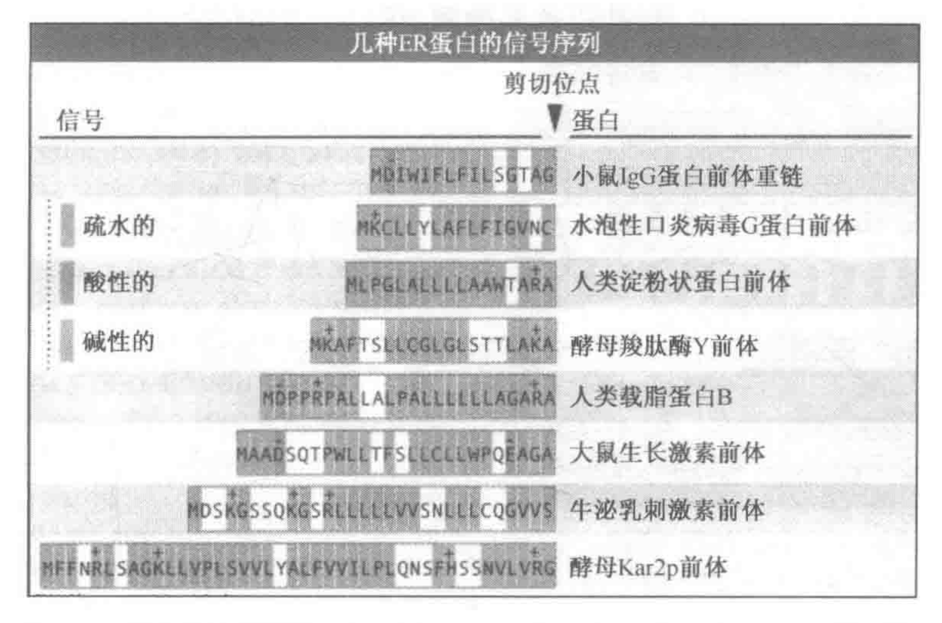


图 3.8　引导蛋白质到达 ER 的各种信号序列在长度和序列上有所不同。这些序列之所以能作为信号，它们的共同特征就是都有一个长的中心区段，该区段疏水性很强，侧面常常是带电氨基酸。左图是沟的尾端视图，右图是沟的顶端视图。

3.4　信号序列被信号识别颗粒（SRP）识别

关键概念

- **SRP 结合到信号序列上。**
- **SRP 结合到信号序列上使翻译速度减慢，这导致当新生蛋白质被运到内质网上时，分子的大部分仍然没有合成并且没有折叠。**
- **SRP54 的 M 区域的结构揉曲性使 SRP 能够识别不同的信号序列。**

信号序列是怎样指引蛋白质到达内质网进行易位的？SRP 的发现证实信号序列是通过特异性的蛋白质-蛋白质相互作用而被识别的。SRP 是胞质溶胶中的小核糖核蛋白颗粒，含有六条多肽和一个小 RNA 分子。当新生肽链从核糖体中伸出来时，SRP 结合到肽链的信号序列上，从而使核糖体-新生多肽复合体能够与内质网膜相互作用。SRP 中只有一个亚基是用来识别信号序列的。这个亚基根据它的分子质量被称为 SRP54，在各物种中很保守，这证明了蛋白质介导的信号序列识别的重要作用。

SRP54 含有三个不同的结构域：

- G 结构域，结合 GTP 并将其水解成为 GDP。
- N 结构域，为 N 端的结构域，与 G 结构域相互作用。
- M 结构域，为 C 端的结构域，含有大量的甲硫氨酸残基。

M 结构域的结构使 SRP 能结合范围广泛的信号序列。图 3.9（见图版）描绘了 M 结构域的结构，该结构域包含若干 α 螺旋，它们聚集成束形成裂口，信号序列就结合到这个裂口中。M 结构域中的甲硫氨酸沿着这个裂口排列，从上到下呈辐射状伸进裂口

中。由于甲硫氨酸的侧链呈疏水性并且是具揉曲性的，伸进裂口中的甲硫氨酸残基就像集合的疏水性鬃毛（bristle）。这些甲硫氨酸使 SRP54 能够结合到信号序列中发现的各种疏水区段。

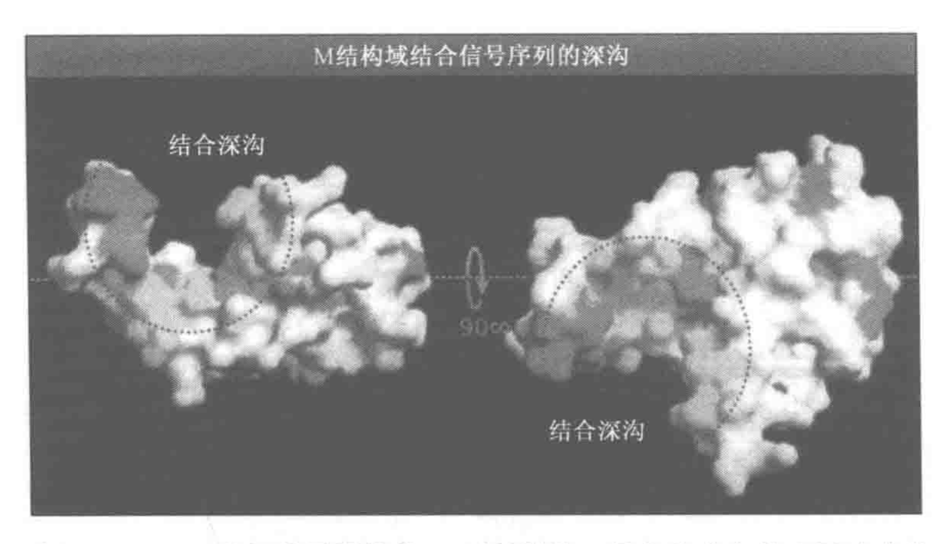


图 3.9　SRP54 的细菌同源物的 M 区域结构。绿色和黄色代表了疏水的氨基酸残基的位置。这些残基形成了一个深沟的表面，据认为信号序列就结合到沟里。复制自 *Cell*. vol. 94，Keenan，R. J.，et al.，Crystal Struture…，pp. 181-191. Copyright 1998，获得 Elsevier 版权许可。

其他两种 SRP 亚基，SRP9 和 SRP14，随着 7SRNA 分子一起结合到核糖体上，可能是通过物理性地干扰翻译的延伸因子（elongation factor）的结合而降低核糖体延长肽链的速度。其抑制强度随着底物的不同而有所不同，但在所有情况下，只有当核糖体成功地停泊到内质网上并且 SRP 被释放后抑制作用才会解除。通过延缓或阻止多肽的合成，SRP 可以保证在核糖体合成的肽链达到一定长度伸出核糖体之前，新生多肽能够传送到内质网膜上。这使得肽链在到达通道之前不能够折叠，因而容易易位。这种延缓作用的重要性得到观察的支持，在体外实验中，如果显著的翻译已经发生之后多肽才被 SRP 识别，蛋白质一般都会失去它们的易位能力。目前还不清楚翻译的制动（translational arrest）究竟是发生在所有生物体中还是在某个机体的所有的易位蛋白中。在某些情况下，新生蛋白质能够足够快地传送到膜上而使翻译制动作用变得不必要。

3.5　信号识别颗粒与其受体相互作用使蛋白质停泊在内质网膜上

关键概念

- SRP 停泊与其受体相结合，使核糖体和新生肽链接近易位子。
- SRP 的停泊需要 SRP 和受体结合 GTP 并水解 GTP。

SRP 对新生分泌性蛋白或膜蛋白的识别仅在靶向运动的前半段完成。一旦结合到 SRP 上后，新生肽链必须被吸纳到 ER 膜上并且被传递到易位通道。**SRP 受体（SRP receptor，SR）**是蛋白复合体，位于 ER 膜的胞质面，在新生肽链传递过程中起着中介作用。

SR 是由两个有关系的亚基组成的二聚体。朝向胞质溶胶的 α 亚基（SRα）与 SRP

相互作用，跨膜的β亚基（SRβ）与α亚基相互作用，并且将其束缚在ER膜上，见图3.10。像SRP54一样，SRα和SRβ都有结合GTP和水解GTP的结构域，这三种蛋白质形成了一个彼此相关联的GTP酶亚家族。这些蛋白质结合和水解GTP的活动对于新生肽链正确地靶向运动到ER膜和传送到易位通道至关重要，对SRP在靶向运送后重新循环进入细胞液中也非常重要。

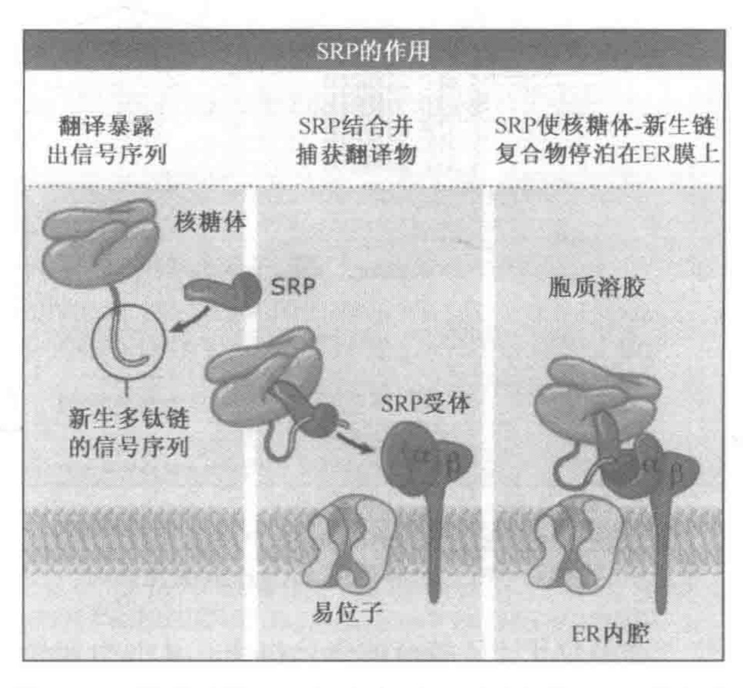


图3.10　当信号序列从核糖体露出后，很快SRP就与它结合，阻止翻译，并使这一核糖体-新生肽链复合物通过与SRP受体相互作用，停泊在ER膜上。

如图3.11所示，靶向运输需要由SRP及其受体来协调的GTP结合及水解。究竟是SRP和SRα在它们相互联合之前就处于GTP结合的状态，还是它们彼此的联合导致了GTP结合？这一切还没有得出定论。在其中任一种情况下，都是结合了信号序列的SRP与SR结合，正在进行翻译的核糖体也与SR结合；SR与易位子结合，并且易位通道的一个亚基可能协助GTP经由SRβ的结合。更进一步，易位子与核糖体-新生肽链复合物结合。因此，有赖于多种组分的协同结合作用，一个复合物形成了。在这一复合物中，SRP与SR的两个亚基都处于GTP结合的状态。可能只有成功地形成复合物才能带来必需的构象变化，导致经过SRP和SRα的GTP水解。SRP和SRα似乎促进了彼此的GTP水解作用，导致了这两种组分大范围的结构重排。核糖体可能也加快通过SRP和SRα的GTP水解。这些构象变化的重要性是导致了核糖体-新生肽链复合物被SRP和SR释放，肽链、核糖体和转移通道之间的相互作用使肽链能够处于正确的位置并准备好易位。

靶向运动所需要的多种相互作用和核苷的水解步骤，可能被用于保障这一过程的速度和精确度。如果一个正在翻译的胞质蛋白的核糖体发现自己在内质网膜上易位子的附近，SRP-SR联合作用的缺失将保证那个胞质蛋白在这里是暂时的，易位不会发生。与此类似，如果一个核糖体定位到一个没有与通道结合的SR复合物上，这种相互作用将

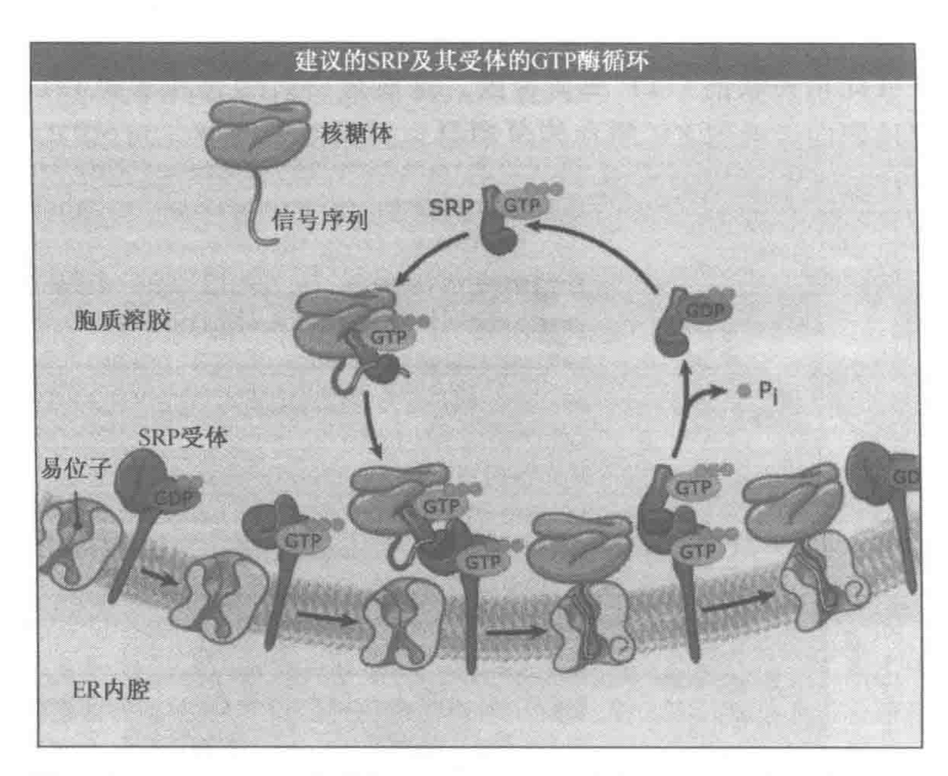


图 3.11　SRP 和 SRP 受体都结合有 GTP，将信号序列释放，并且使其插入易位通道中。此后，GTP 水解促使 SRP 与其受体分离。

缺少来自核糖体-易位子和易位子-SR 结合的强化作用，从而引起经 SRP 和 SR 的 GTP 水解无法顺利进行，以至于在肽链本当穿过的易位子不存在的情况下，肽链不能被释放。

核糖体在从 SRP 中释放出来时与易位子结合。这是通过核糖体和组成通道的蛋白质之间的直接相互作用而发生的。这些接触使核糖体立刻定位到通道的胞质端上，从而使新生多肽直接在二者之间移动。核糖体与通道之间的相互作用一开始比较弱，但在易位期间会增强，并且以一种形式或另一种形式持续。

关于定向和易位还不太清楚的一个地方是，多个核糖体在一条 mRNA 上的聚集（多聚核糖体）是如何影响定向过程和易位子的组装的。一旦 mRNA 上第一个核糖体合成的蛋白质定位到内质网，跟随在后面的其他核糖体可能不再需要 SRP，因为它们已经位于内质网膜附近了。使用荧光共振能量转移（FRET）技术（这种技术可以测出两个分子之间的距离）已经发现，被占据的易位子比起空易位子发生轻微的结构改变时，整个通道仍然保持聚合并且基本上处于准备易位状态，甚至当该通道没有被占据时也是如此（FRET 技术的细节见TECH：3-0001）。于是，SRP-SR 相互作用可能只在定位起始时需要，这之后，随后的核糖体会很快接连地与易位子结合，同时信号序列被通道识别的事件作为一种校对步骤来保证每一个被易位的多肽确实是一种分泌性蛋白或者跨膜蛋白（见 3.7 大多数真核生物的分泌性蛋白和膜蛋白其翻译和易位是耦联的）。

3.6 易位子是一种引导蛋白质通过的水性通道

关键概念

- 蛋白质穿过一种水性通道进行易位，该通道位于内质网膜中，由 Sec61 复合物组成。
- 很多参与易位、折叠和修饰的辅助蛋白都与通道相连接。

蛋白质通过穿过一种充满水的通道（aqueous chnnel，水性通道）而穿越内质网膜，这种通道横跨内质网膜，专门用于蛋白质易位。该通道和其他与其紧密结合的蛋白质合起来被称为易位子（translocon）。这一复合物的结构是动态的，在易位本身被考虑之前，易位子的很多细节值得探究。

要想证明用于蛋白质穿过内质网膜的通道的存在是非常困难的。在信号假说提出来时，已经提示有通道，但人们也提出了很多其他设想，如分泌性蛋白可能直接穿过双层脂膜。关于通道存在的第一个有力证据来自电生理学实验，该实验测定了离子穿过来自粗面内质网的小泡（microsome，微粒体）的能力。由于离子不能穿过纯粹的脂双层，故检测到的任何导电（conductance）现象都能够揭示跨膜通道的存在。微粒体中没有易位现象发生（因为去除了去其相连的核糖体），只有非常小的电传导。与此类似，当膜上占据着正在进行多肽易位的核糖体时，离子也不能够通过膜。然而，如图 3.12 所示，如果新生蛋白质从核糖体中释放时，该核糖体还没有与膜脱离，电传导现象就会发生。

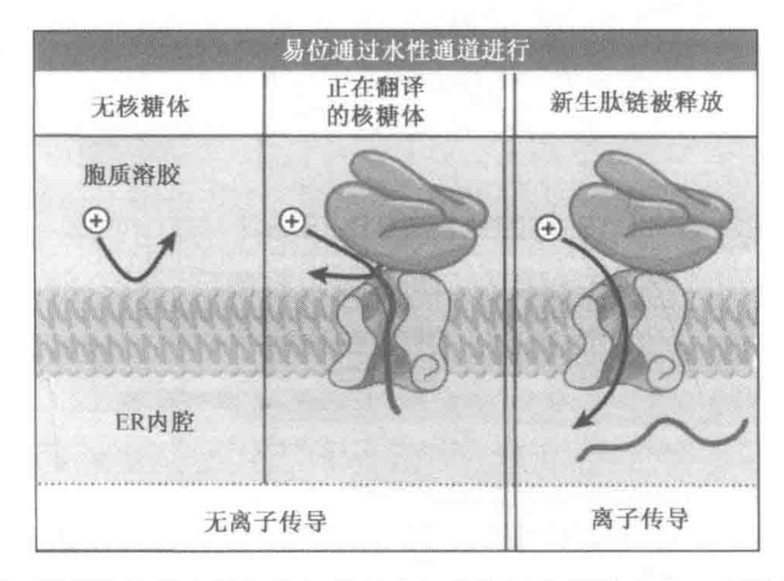


图 3.12 只有被转移的新生多肽从它所结合的核糖体上释放出来，离子才能穿过 ER 膜。这表明新生肽链可能是通过水性通道穿过膜的。通道需要核糖体保持开启状态，因为如果在新生多肽被释放后核糖体被去除的话，离子传导就不会发生。

从这一实验得出两条结论：

- 离子能够穿过被核糖体稳定的水性通道；当核糖体不在时离子不能穿过。
- 新生肽链占据着这种通道，只有当新生肽链被释放时离子才能够穿过该通道。

后来的一些实验使用其他技术证明了通道的存在，实验直接证明，当新生的分泌性蛋白穿过膜时它们处在一种水性环境中。

那么是哪些蛋白质构成了易位通道？通过一些标准可以鉴定那些可能的组分，包括最靠近正在易位的新生肽链的，以及与膜上的核糖体相互作用的。为了找出适合这些标准的蛋白质的功能，微粒体被溶解在去垢剂中从而将膜蛋白溶解。图 3.13 显示了如何将蛋白质分离出来去发现易位所需要的一批必需组分。各种蛋白质分别被重组进封闭的脂类小泡，这种小泡被称作**脂蛋白体（proteoliposome）**，在体外易位实验中取代了微粒体。以这种方式可以控制这种内质网替代物的确切组成，从而可以确定在易位过程中每一种蛋白质的重要性。从概念上说，这种处理方法就像将一辆汽车拆开，然后将各组件重新装配在一起，找出那些仅仅使汽车能够开动的绝对必需的组件。引擎以及一些其他组分是必不可少的，但如刹车这些做调节用的性能将被舍弃。

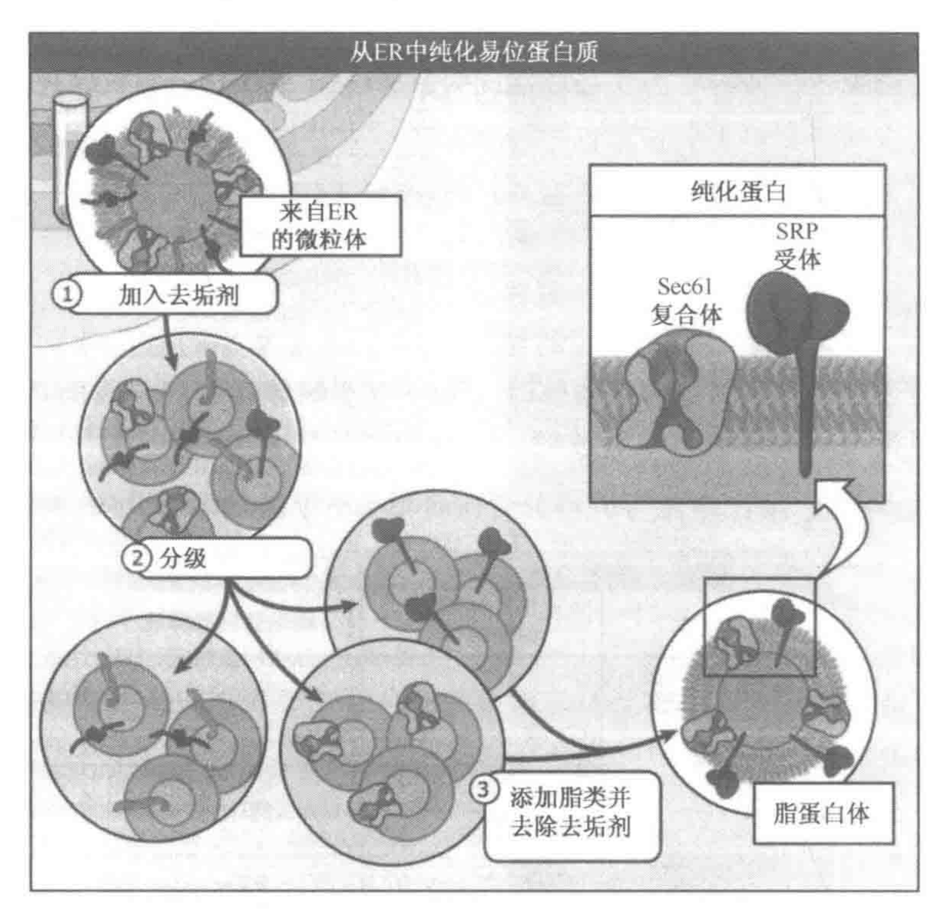


图 3.13　去垢剂能够用来将来自 ER 的微粒体分散成为蛋白质和脂类的小微团。然后将这些微团分级，能够使目的蛋白纯化。将去垢剂除去并且添加新的脂类，仅含有目的蛋白的小泡就会形成。

这一方法证明，只有 SRP、SR 和一个由三种跨膜蛋白组成的复合物（Sec61）是一些蛋白质易位时需要的。SRP 和 SR 都参与了蛋白质定向过程，剩下 Sec61 复合物是形成易位蛋白通行的通道的重要候选成分。

Sec61 在广泛的物种中具有保守性，预示这个复合物在易位过程中发挥着独特的重要作用。Sec61 复合物中的蛋白质最先在酵母中得到鉴定，该实验使用了特别设计的基因筛选法来寻找分泌性蛋白进入内质网所需要的基因。用这一方法获得了若干基因，其中包括 *SEC61*。该基因编码的蛋白 Sec61p 是一种跨 ER 膜 10 次的膜内在蛋白。该蛋白质的一个同源物 Sec61α 存在于哺乳动物体内。体外生物化学实验表明，Sec61p 围绕着

正在易位的蛋白质，如此，很像是形成了通道的壁。通过遗传学和生化分析已经揭示 Sec61p 与其他两种比较小的蛋白质紧密联系，这两种小蛋白质的确切功能还不清楚：

- Ss1p（在哺乳动物中是 Sec61γ）和
- Sbh1p（在哺乳动物中是 Sec61β）。

合起来，这三种组分组成了异源三聚体 Sec61 复合物。

Sec61 复合物的详细结构已经通过研究古细菌 *Methanococcus jannaschii* 中的 SecY 复合物得到了解决；这一复合物在结构和功能上都与真核生物体内的 Sec61 复合物同源。这一结构很快揭示了易位通道的一些显著特征。特别值得一提的是，通道内部由 Sec61α 的跨膜结构域组成，形状基本上像一个计时的沙漏（hourglass），就像一个孔被一个小栓塞住，小栓由 Sec61α 的一个区段构成，如图 3.14 所示。从核糖体的角度来看（即从细胞液端来看），Sec61α 跨膜结构域 1～5 形成了蛤壳状排列结构的一半，跨膜结构域 6～10 形成了另一半。Sec61γ 位于这两半之间。

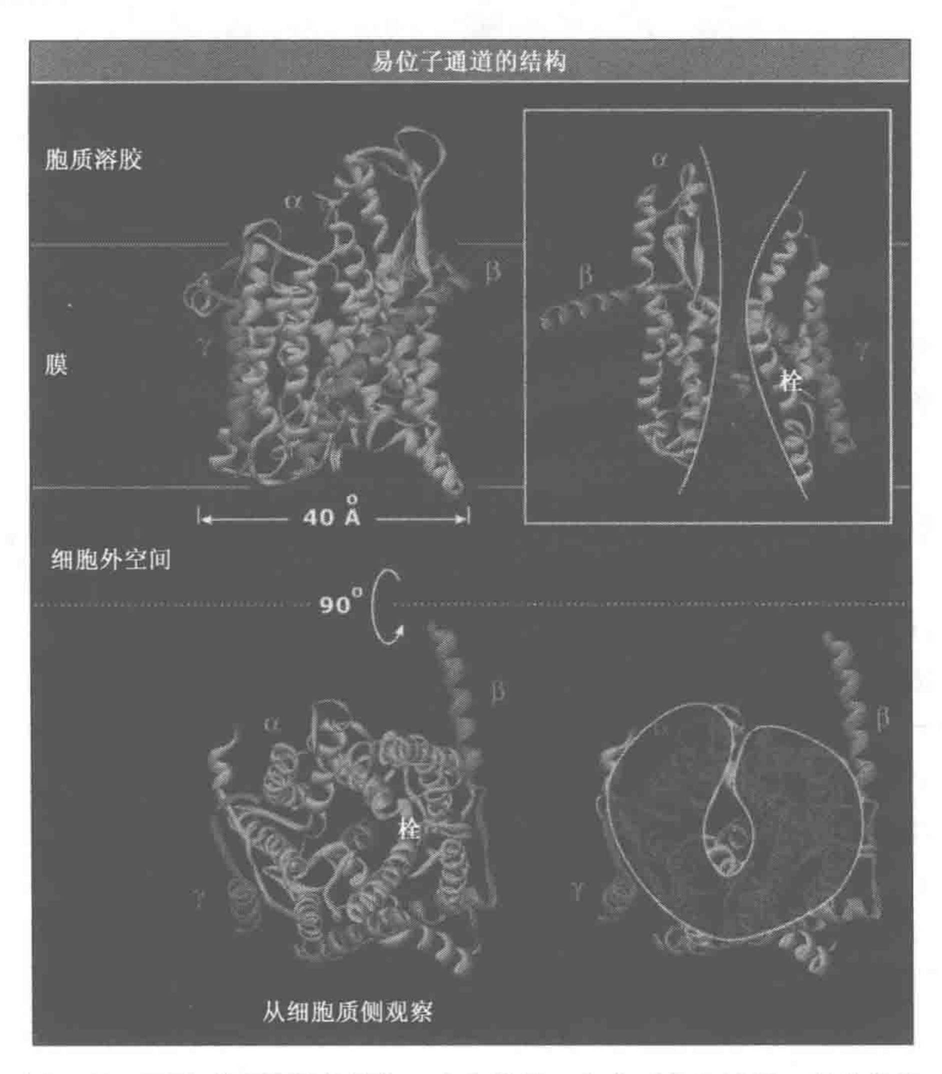


图 3.14　通道形成沙漏状结构，中心孔被一个小“栓”封闭，据认为这个小“栓”会在信号序列结合到通道后离开中心孔。在右上角的插图中，一些跨膜螺旋被去除来显示沙漏状的孔。从细胞液视角显示出跨膜螺旋的蛤壳状排列。该图来自 Protein Data Bank file 1 RHZ。

新生多肽链很可能必须穿过沙漏状通道中心的孔，这一过程需要孔上的栓被移除。设计了一系列生化实验，来寻找在通道打开或关闭状态中的那些彼此相邻的通道区段，

实验结果提出了一个孔开合的机制。蛋白质易位开始时，首先发生的事件是通道识别肽链的信号序列（见 3.7 大多数真核生物的分泌性蛋白和膜蛋白其翻译和易位是耦联的）。这一事件可能引起栓从孔中移位。重要的是，这一事件只在新生肽链已经接合上通道时发生，那么此时通道的孔会被肽链占据而不是栓，如图 3.15 所示。除此之外，通道的孔相当狭窄并且被可柔曲的疏水氨基酸围绕。因此，正在易位的肽链可能占据了孔道的全部空间，而离子在孔道中的移动受阻。

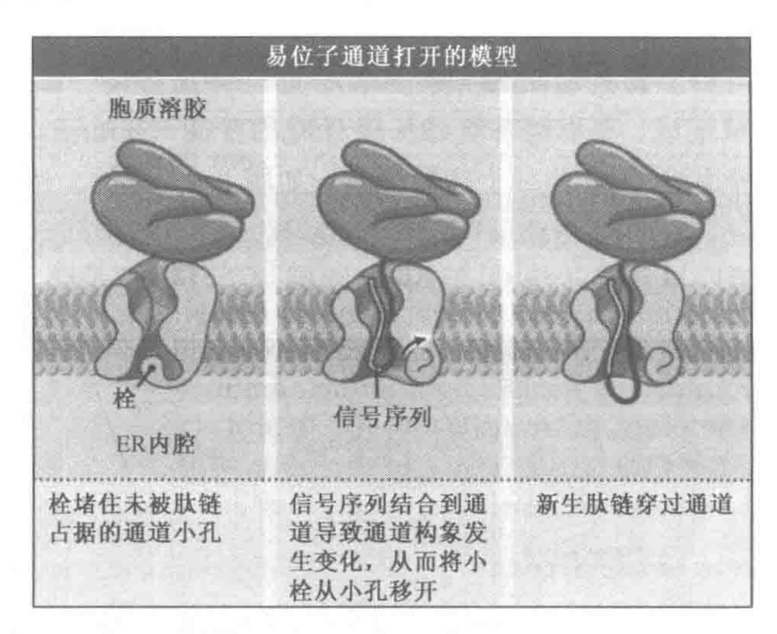


图 3.15　信号序列结合到通道可能导致了通道发生构象变化，从而将小栓移位，使肽链能穿过这个狭窄地开启的通道。

在确定 Sec61 复合物的结构之前已经知道这一复合物是以三聚体或四聚体形式相互联结的，并且以前认为形成一个通道需要多个 Sec61 复合物。虽然如今看起来通道不大可能由单个 Sec61 复合物（即含 Sec61α、Sec61β、Sec61γ 各一个）构成。但三个或四个 Sec61 复合物之间相互联结的理论阐述还不清楚。

尽管通道本身是由 Sec61 组成的，其他参与了蛋白质易位或修饰的蛋白质都位于通道附近，而 Sec61 复合物可以被认为是一个脚手架，在其周围的一些蛋白质参与了蛋白质的定位、易位，以及在内质网中的折叠和修饰。例如，除了上面描述的核糖体和 SR 复合物的集合外，每一个活动的易位子上都有信号肽酶（signal peptidase）复合物，它切除易位蛋白上的信号序列。还有寡糖基转移酶（oligosaccharyltransferase，OST），这是一个酶复合物，可以将糖基共价连接到被易位的肽链上。还有许多功能未明确的蛋白质也与新生肽链相互作用。易位链连结膜（translocating chain-associating membrane，TRAM）蛋白也被发现经常与信号序列和易位蛋白的跨膜结构域紧密相连。与剪切或修饰新生肽链的酶不同，TRAM 蛋白是某些蛋白质的易位过程所需要的，并且参与了这一过程的多个步骤。易位子联结蛋白（translocon-associated protein，TRAP）也在易位蛋白附近，这一复合物与 Sec61α 一样含量丰富，它协助通道识别信号序列，虽然其机制还不知道。已经清楚的是，通道并不是单独作用，而可能是一个大的蛋白质复合物的一部分，这个复合物影响和调节易位过程，以至于细胞可以在任何时候按照需要来变更单个蛋白质的易位。

3.7 大多数真核生物的分泌性蛋白和膜蛋白其翻译和易位是耦联的

关键概念

- 易位子和信号序列之间的相互作用促使通道打开并启始易位。
- 易位的确切机制可能随着蛋白质的不同而不同。

在核糖体连结的新生肽链的靶向运动与停泊发生之后，多肽就必须开始穿越内质网膜。有关这一过程的知识大多来自对比较少的模式蛋白的研究，是在无细胞系统中重建易位过程。蛋白质成功地易位有赖于肽链、通道和核糖体之间一系列相互作用的协同。这些相互作用导致了通道结构以及通道与核糖体和新生肽链连结的改变。

信号序列从内质网膜上的 SRP 中释放出去后，保持核糖体与膜接触的唯一的相互作用是在核糖体和通道之间。这种联系单独地并不足以在没有 ER 膜上的新生肽链识别步骤的情况下启动易位。但这一步骤是必需的，因为不管是否有被翻译的底物，核糖体与通道之间具有虽小却显著的固有亲和力。如果核糖体与易位子之间的相互作用单独就足以启动易位，那么细胞液蛋白也会被转移。有一个步骤阻止了这种情况发生，那就是

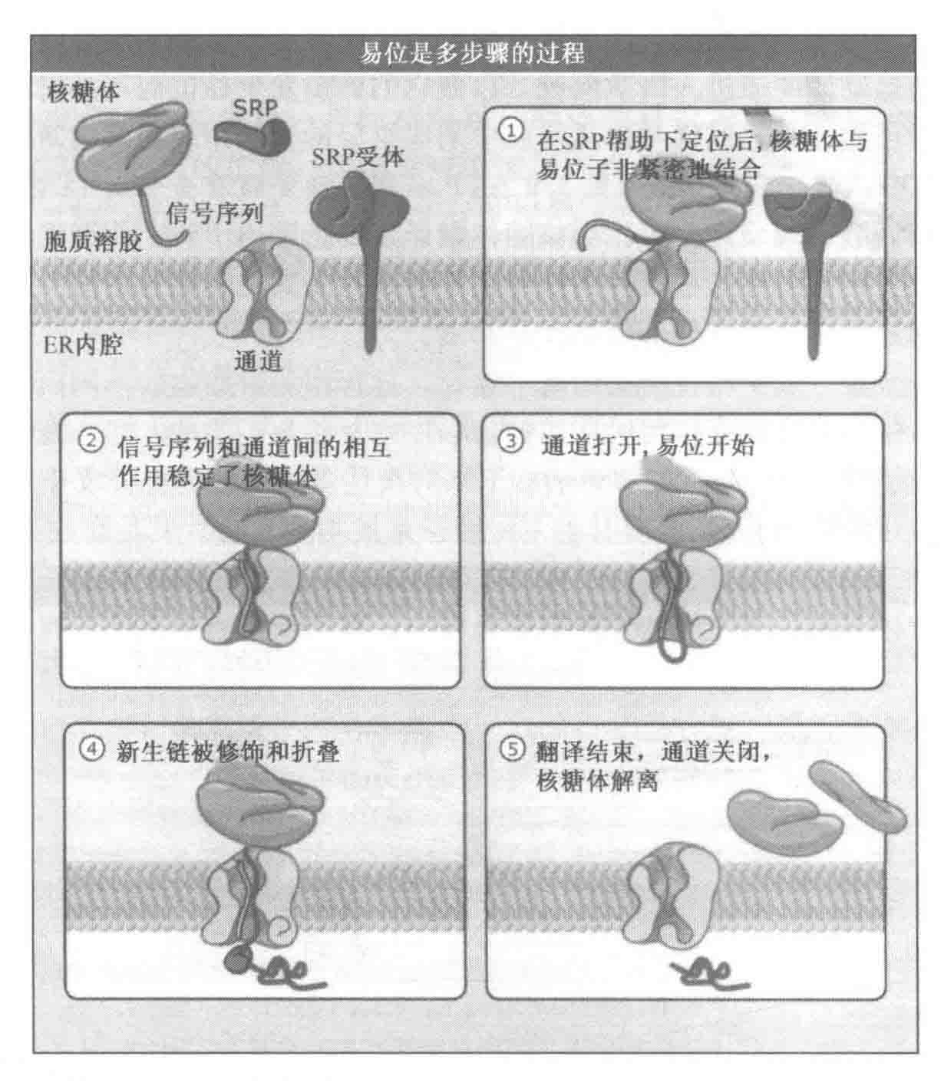


图 3.16 新生肽链进入 ER 腔还不能延长，直到通道已经识别出信号序列并且紧紧地结合上核糖体后，肽链才能进一步延伸。在肽链易位开始后，很快就进行肽链的折叠和修饰了。

蛋白质停泊后，通道必须识别信号序列。

图 3.16 显示的是通过信号序列识别而带来的核糖体与易位子之间相互作用的变化。在 SRP 停泊及释放之后，核糖体仅松松地结合在易位子上。这使新生肽链的信号序列及其他部分暴露于细胞液中，但又立即靠近通道的端部。新生肽链的延长重新开始后不久，信号序列被 Sec61α 识别。一般认为识别过程需要信号序列呈袢环状插入到通道中，N 端朝向细胞液，而 C 端朝向内质网腔。蛋白质这样取向以便穿过通道，从核糖体中退出并进入内质网腔。

信号序列的识别以及插入使肽链得以易位，并引起占据着通道的中心栓移开以及肽链成熟部分（即紧接在信号序列后面的部分）伸入孔中。此时，核糖体与通道的联系更加紧密。所有这些事件，从信号序列插入到通道打开，都在核糖体定位后很快发生。只需要多肽链添加很少一点延长，刚在蛋白质的大部分合成前不久，这些事件就完成了。对分泌性蛋白来说，只需要 40 个氨基酸从核糖体中伸出就可以了。

一旦通道打开，大多数分泌性蛋白继续进入内质网腔中。以前大家普遍认为核糖体与易位子之间的相互作用非常强，以至二者之间形成物理性的封闭，从而有效地阻止了正在易位的肽链逃回细胞液中。然而，通过很多生化实验和结构方面的实验，证明核糖体与易位子之间有一个实实在在的空隙，至少在一定的环境下，新生肽链的一部分肽段能够通过这个空隙滑进细胞液。因为易位中的肽链明显有机会进入细胞液中，不知道是什么使肽链的运动倾向于进入内质网腔，以便它们确实发生易位而不是简单地掉入细胞液中。有一种可能性是，肽链与内质网腔中某些组分的相互作用约束住新露出的肽链使其留在 ER 腔中，防止它掉出去（见 3.9 ATP 水解驱动蛋白质易位）。无论是哪种机制，易位的肽链偏好进入内质网腔中。当核糖体翻译至终止密码子时，肽链被释放到内质网腔，然后通道关闭。虽然这些事件的顺序还不清楚。尤其是究竟通道的关闭是由肽链完全穿过它引起还是由于核糖体的解离尚不知道。

尽管这些步骤构成了易位所需的基本途径，过程却随着底物的不同而有所变化。例如，不同的肽链与通道相互作用时所用的信号序列显然是不同的，打开通道的方式也是不同的。信号序列识别的模式能够影响接下来的某些蛋白质的生物合成步骤。一些蛋白质在 Sec61 和 TRAM 之外还需要其他 ER 因子来成功地易位。其他蛋白质也是按同样的基本途径开始易位，但是易位刚开始不久，后来的步骤就有所变化。例如，一些蛋白质似乎从核糖体与易位子之间的空隙短暂地滑出，在回到通道中之前，有大段暴露于细胞液。因此，如果因易位过程有一定的基本特征，就认为易位过程是一种使蛋白质跨膜移动的一成不变的机制，这种想法可能过于简单了；其实更像是一种蛋白质穿过易位子的特定途径将以还没有意识到的方式影响蛋白质的生物活性。

3.8 一些蛋白质翻译后才进行定向移动和易位

关键概念

- 翻译后的易位过程不依靠核糖体和 SRP。
- 翻译后的易位在酵母中被广泛应用，但在高等真核生物中较不普遍。
- 翻译后易位子在组成上不同于共翻译易位子，但是它们具有同样的通道。

在共翻译易位（cotranslational translocation）过程中，蛋白质的定向移动和易位的开始在新生链合成的很早期就发生了。这制止了蛋白质在细胞液中就呈折叠构象，折叠构象将是难以易位的。另一种易位途径允许蛋白质在细胞液中完全合成，仍保持未折叠状态，以便蛋白质以后能被易位。这种翻译后易位（posttranslational translocation）形式广泛存在于单细胞真核生物中，也有可能发生于更高等的真核生物中。这种易位方式不依赖 SRP 和核糖体，并且无论从装置和机理上都与共翻译易位不同。

关于蛋白质靶向（targeting）和易位的第二种途径，最早的证据来自对很多酵母蛋白的观察，这些蛋白质能在体外进行易位，甚至被核糖体释放后都可以易位。与这种想法（第二种途径）一致的是，缺乏 SRP 的 *S. cerevisiae* 细胞仍然能存活，在这些细胞中，许多蛋白质仍然保持着易位能力。现在很清楚，在正常条件下，一些酵母蛋白只使用两种途径之一的易位方法，但大部分蛋白质有能力高效地使用其中任一种方法。

在翻译后易位途径中没有识别信号序列的细胞质因子。信号序列是否足够疏水从而能够与 SRP 相互作用，似乎可以决定使用哪一种途径。如果信号序列不能够与 SRP 相互作用，就没有什么会延迟蛋白质的翻译，并且在合成完全结束后，蛋白质被定向移动和易位。

在共翻译易位期间快速定向移动的一个后果是防止了易位物质在细胞液中折叠。在定向移动之前，露在核糖体外面的肽链还太短不能够折叠，而一旦蛋白质位于通道的封闭空间中，折叠便不能够发生。与此相对照，翻译后易位的底物（posttranslationally translocated substrate）的折叠，在细胞液中因蛋白质与属于 hsp70 家族的蛋白伴侣结合而被抑制（见MBIO：3-0001）。这些蛋白质利用 ATP 水解来不断地结合和释放翻译后的蛋白质，防止蛋白质折叠或聚集。这样，使蛋白质有机会与通道相互作用。

翻译后易位过程不涉及像 SRP 那样的组分，SRP 是在蛋白质到达膜之前识别信号序列。不同的是，翻译后的蛋白质被一种多蛋白复合物募集到易位子处，这个多蛋白复合物是翻译后易位子的一部分。像共翻译易位子一样，翻译后易位的易位子含有三聚体 Sec61 复合物。不过，它还包含四种其他蛋白（Sec62p、Sec63p、Sec71p 和 Sec72p），见图 3.17。这些蛋白质形成一种亚复合物（subcomplex），它向细胞液和内质网腔暴露

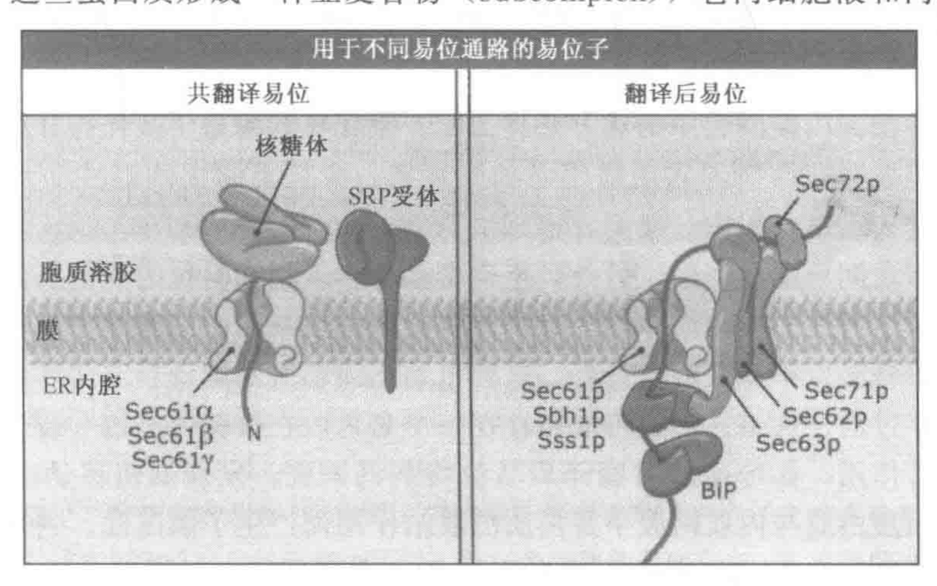


图 3.17　不同的蛋白质与同一个通道相互作用，促进共翻译易位或翻译后易位。

大量结构域。这些结构域中的一个或者更多可能参与了底物的定向移动，虽然具体机制还不清楚。

关于与辅助蛋白变化群（alternate groups of accessory protein）相联结的核心易位通道的概念曾经在穿越叶绿体外膜的蛋白质易位中提出过（见 3.29 蛋白质进入叶绿体时也必须跨过两层膜）。总地来说，这类系统赋予细胞一种灵活性去调节一定底物或者一群底物的易位，而不是必须为每一种底物易位使用不同的通道。这与转录因子对基因表达的调节类似，这些转录因子仅结合到基因的某种特定的启动子上，与 RNA 聚合酶复合体相互作用来启动或关闭转录过程。

肽链到达易位子后，通道识别信号序列，如同在共翻译易位中一样。因为定向移动与 SRP 无关，故识别事件非常重要，它能够保证胞质蛋白不被易位。在翻译后易位中，对信号序列的识别可能使通道打开，这与共翻译模式中一样。翻译后定向移动的信号序列被通道识别而不是被 SRP 识别的能力，说明虽然信号序列的疏水性是结合到这两种组分的主要决定因素，是由 SRP 还是通道识别信号序列一定还受到其他未知因子的影响。

虽然翻译后易位在 *S. cerevisiae* 中广泛使用，在高等真核生物中，关于这种途径的证据不是很充足。迄今为止，这种形式的易位仅仅有很少的底物在体外实验中得到了证实。在这种情况下，蛋白质在细胞液中折叠成稳定的二级结构是不太可能的。在体内这些蛋白质是否确实在翻译后定向移动还没有得到清楚的证实。然而，Sec62p 和 Sec63p 在高等真核生物中有同源物。因此，有可能翻译后易位以某种形式被使用，或者这种装置还有其他用途。

3.9 ATP 水解驱动蛋白质易位

关键概念

- **翻译后易位所需的能量来自内质网腔中 BiP 蛋白对 ATP 的水解。**
- **共翻译易位所用的能量来源不清楚，但可能与翻译后易位中的一样。**
- **在细菌中大多数易位现象发生在翻译之后，易位穿过的通道在进化上与 Sec61 复合物有关系。**

蛋白质易位到内质网腔中的动力是什么呢？生化实验测量了荧光探针跨过微粒体膜的迁移，分析表明核糖体停靠于通道是如此紧密，像是要制止肽链移动到任何别的地方，只能穿过通道进入腔中。然而，根据核糖体-易位子复合物的电子显微镜图像推测核糖体与通道之间可能有空隙。另外，生化实验分析了正在易位的肽链暴露于细胞液中的情况，显示出对许多蛋白质来说，有很多机会肽链被暴露于细胞液中，所以蛋白质移动进内质网不是必定被保证的。另外，这种机制不能够解释翻译后定向移动的蛋白质怎么能被驱使穿过易位通道。不过可能还存在一个角色，在核糖体“推”新生肽链进入内质网腔时起着作用，如今通过对翻译后易位机制的研究，发现肽链移动进入内质网腔看来更像是因蛋白质与内质网腔中蛋白质的联结作用而产生了倾向性。当共翻译易位的能量来源还没能解答时，ATP 水解在翻译后易位中的作用已经被更直接地研究并且得以在此表述。有可能共翻译转移也采用了类似的机制。

驱动翻译后易位进 ER 的能量来自腔内 hsp70 Bip 对 ATP 的水解。Bip 通过与 Sec63p 腔内结构域的瞬间联结作用被带到了紧靠翻译后易位通道的地方。如图 3.18 所示，未结合的多肽链通过布朗运动在通道中既可以向前也可以向后运动。在易位的**布朗棘齿模型（Brownian ratchet model）**中，BiP 的功能是当其从通道中露出时结合到新生肽链上，并阻止肽链滑回细胞液（BiP 是折叠的，故不能穿过通道）。新生肽链的每一个新片段进入腔时都会被一个新的 BiP 分子结合，易位就以这种增长方式进行。这样，BiP 使肽链的运动偏朝一个方向。在这个模型中，ATP 的水解增强了 BiP 与肽链的相互作用，后来的 ATP/ADP 核苷酸交换引起 BiP 将底物释放。这一模型得到了实验的支持，实验显示，将 BiP 从内质网腔中去除使易位受到损害，但是当向腔中添加任何能够结合新生肽链的大分子时，易位效率得到了恢复。甚至可能腔中新生肽链自身的折叠也能够防止肽链落回到细胞液中，这表明更容易折叠的蛋白质可能比那些在易位蛋白中占更大比例的倾向于保持未折叠状态的蛋白质更容易易位（虽然这点还没有被证实）。一旦肽链与通道相互作用开始易位，据推测肽链必须先从与胞质溶胶 hsp70 及其他胞质溶胶蛋白的相互作用中解放出来；否则肽链像是将要停留在内质网外，正如本来它会穿

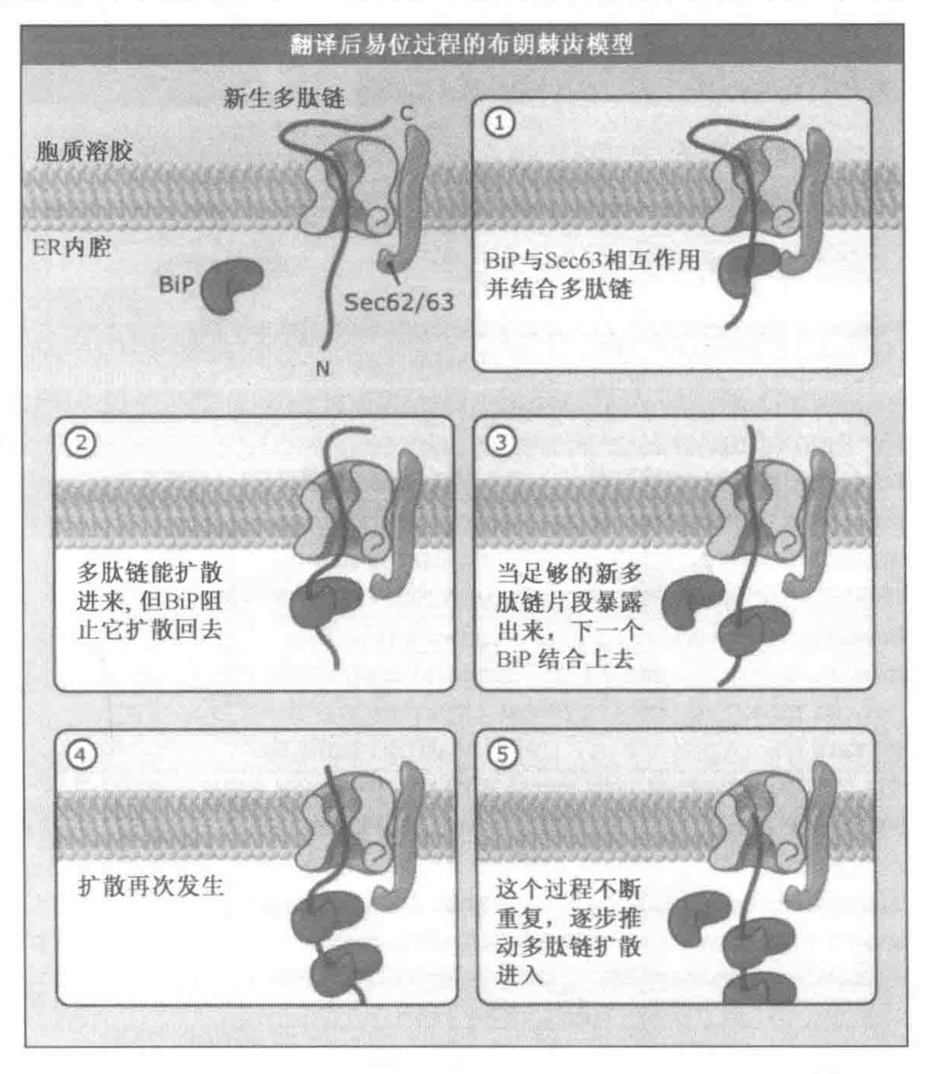


图 3.18　在与 Sec62/63 短暂的相互作用后，BiP 分子就会结合到新生多肽上。由于 BiP 太大，不能进入通道内，结合上的 BiP 分子允许多肽扩散进来但阻止它向细胞液中扩散。每一个 BiP 都会捕获在 ER 腔中的多肽链的一个新片段。

过通道的。然而，正在易位的肽链与胞质溶胶蛋白之间相互作用的特征还没有被描述。值得一提的是，当 Sec61 复合物和 SR 是易位过程仅有的必需蛋白时（见 3.6 易位子是一种引导蛋白质通过的水性通道），在这些最低条件下，大多数蛋白质的易位效率相当低，也许是因为缺少了协助蛋白质运动的腔内蛋白。

与布朗棘齿模型相比，**主动牵引模型（active pulling model）**提出 ATP 的水解引起了 BiP 的构象变化，导致结合的肽链被牵引穿过通道。这种机制已经在蛋白质翻译后易位进入线粒体实验中得到了证实，该实验显示，以这种方式多肽能被牵拉跨过膜（见 3.26 信号序列也用于定向运输蛋白质到其他细胞器）。虽然对于进入内质网的翻译后易位，布朗棘齿模型在一些情况下是能胜任的，对那些在细胞液中具有某些结构或仍然结合在 hsp70 上的肽链来说，主动的牵引是需要的。由于牵引（力量的产生）难以用实验来证明，所以还很难区分这两种可能的翻译后易位模式的贡献。

尽管本章主要是有关真核生物的，蛋白质分选问题在原核生物中也存在，原核生物也产生分泌性蛋白和膜蛋白。在细菌 *E. coli* 中，蛋白质是翻译后易位的。在酵母中也与翻译后易位类似，蛋白质在易位前保持未折叠状态，信号序列的识别发生在通道处。如在真核生物中那样，细菌中易位进行是通过一个水性通道，该通道主要由三种蛋白质

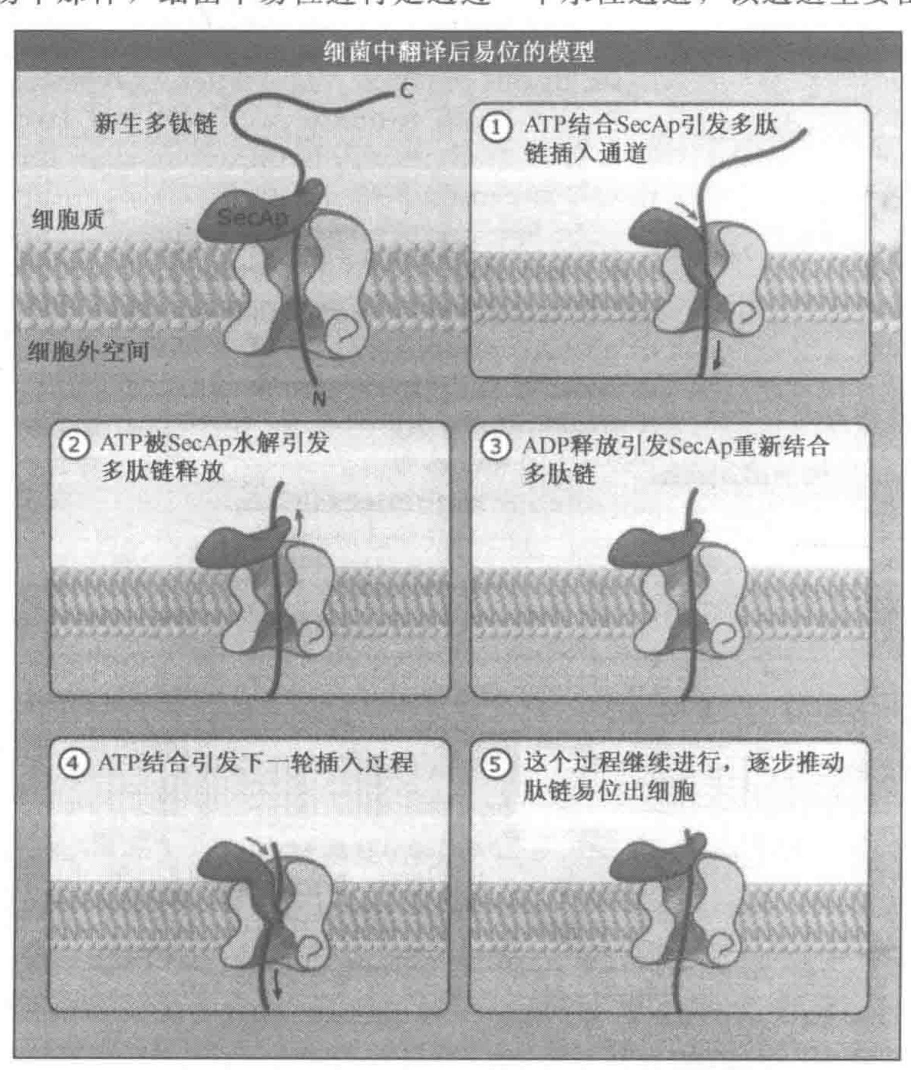


图 3.19 SecA 蛋白位于通道的细胞质端。SecA 反复结合到新生多肽上促使其片段进入通道中，最终将整个蛋白质转移进去。在这一过程中，SecA 蛋白的某一个结构域循环式地插入通道中然后再从通道中出来。

组成，这些蛋白质合起来被称作 SecYEG 复合物。SecY 蛋白是 Sec61p 和 Sec61α 在细菌中的同源物。然而，由于细菌没有膜性细胞器，易位是直接穿过质膜进行的。由此而来的一个推断便是驱动易位的能量来源，SecAp（SecA protein，SecA 蛋白），它行动于膜的细胞液面，而不是像真核生物中的翻译后易位那样在膜的接收一侧。其中一个可能的 SecAp 工作模型如图 3.19 所示，提出位于通道的细胞液一端的 SecAp 反复地插入到通道中，每一次将蛋白质的一个新片段拉进去然后释放。SecA 对 ATP 的水解循环协调着多肽的结合和释放。目前还不清楚在每两轮 SecAp 作用期间是怎样防止肽链扩散回细胞液中的。影响原核生物中多肽易位的一个额外的因素是存在跨膜的电化学电位，它帮助驱动易位，尽管具体机制还不清楚。

比较共翻译易位、翻译后易位和细菌的易位，明显地看出以下两方面情况，即跨膜迁移基本面的保守性和不同情况下易位过程采用的方式。在所有情况下，基本面——穿过水性通道迁移——都是一样的。然而，易位的底物以及这些底物定向移动和穿过通道的方式是不同的。

3.10 跨膜蛋白穿出易位通道进入膜脂双层中

关键概念

- **跨膜蛋白的合成需要其跨膜结构域被识别并且整合到脂双层中。**
- **蛋白质的跨膜结构域通过沿着蛋白质-脂的分界面水平移动而退出易位子。**

分泌性蛋白和跨膜蛋白定向到达易位通道以及启始易位的方式是相似的。然而，膜蛋白的易位必须与**整合（integration）**或插入 ER 的脂双层协调起来。蛋白质的跨膜结构域多次横跨脂双层，整合发生在它被易位子识别之时，蛋白质停止转移进内质网腔，水平地移出通道进入脂双层。以这种方式，许多不同类型的跨膜蛋白能够被合成并整合，包括多次跨膜的蛋白质。

膜蛋白整合的第一步是跨膜结构域被易位子识别。这些结构域是由大约 20 个疏水氨基酸组成的片段。由于它们的疏水特性，一些跨膜结构域也会被 SRP 当作信号序列而识别。这些所谓的**信号锚定序列（signal anchor sequence）**首先将新生蛋白定向（target）到内质网，然后像普通信号序列一样插入到通道中。然而，信号锚（signal anchor）并不会从蛋白质上切下来而是整合到了膜中。图 3.20 显示，与信号锚定序列相对照的是，大多数跨膜结构域被易位子识别是在它们从核糖体中露出来，通过 N 端信号序列定向运动之后。对这些结构域来说，不是从 SRP 转移，是必须通知易位子跨膜结构域已经合成好了。

一个跨膜结构域在易位子内，最直接地说明了结构域自身的疏水性，因为它的构造，易位子通道能察觉它。如图 3.21 所示，易位子的结构表明通道能像一个蛤壳那样开启，让跨膜结构域同时接触通道和脂双层。事实上，信号序列和跨膜结构域很像是在蛤壳口的附近结合到 Sec61α 上，然后这种结合可能引起通道侧向打开。这种分界面（interface）存在的证据来自实验，该实验证明了通道内的跨膜结构域与 Sec61α 和脂都接触。结果，即使易位子提供了穿越膜的水性通道，易位的多肽足够疏水的区段仍能够在它们易位时去尝试膜的脂环境。含有极性氨基酸的片段可望不停留就穿过通道，而疏

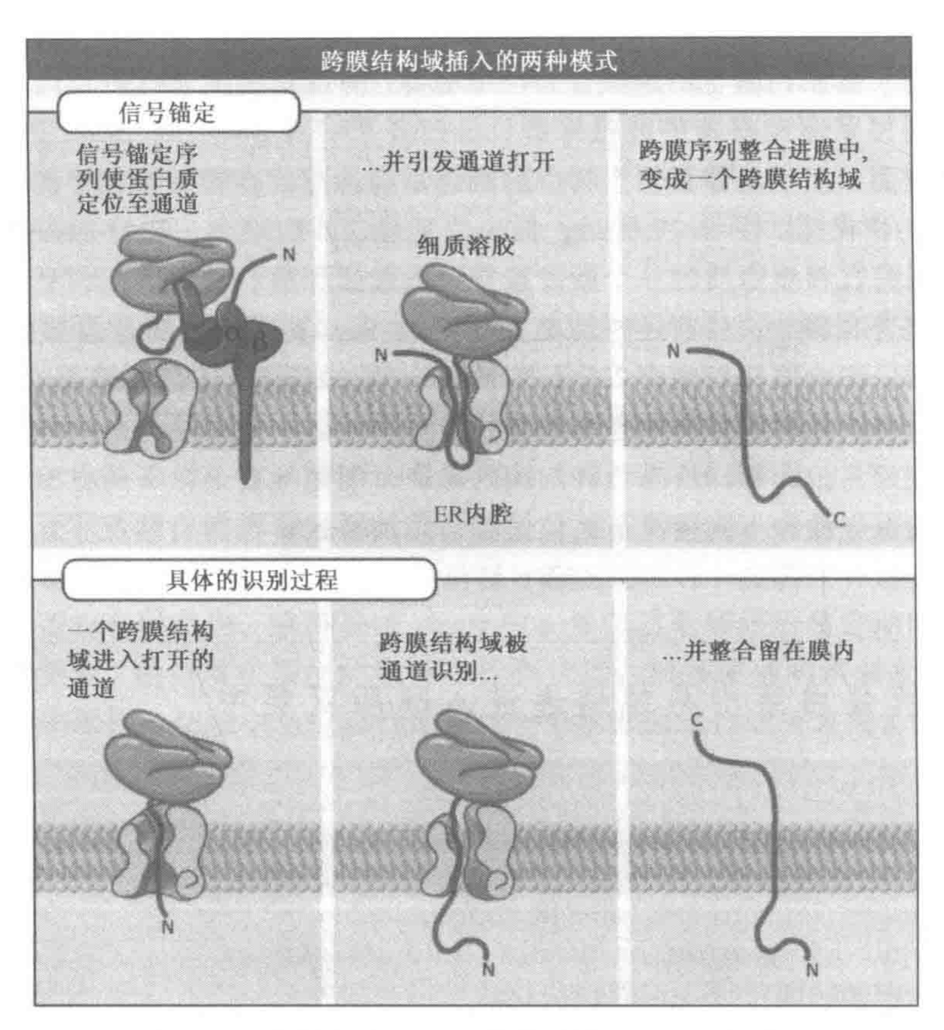


图 3.20　信号锚定序列直接从 SRP 转移到易位子处，但其内部的跨膜结构域必须在从核糖体中出来时就被识别。

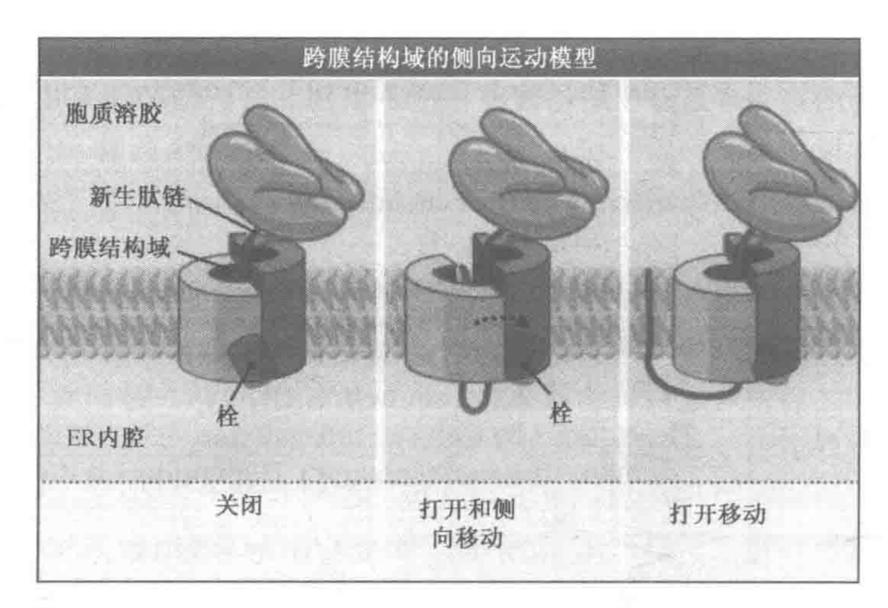


图 3.21　易位子就像一个圆筒，能够开启和关闭，以两种方式使新生多肽能够穿过孔并且使跨膜结构域移进膜中。

水结构域会与膜脂强烈地相互作用，并且仍然与通道内壁结合，从而停止易位。见图 3.22。

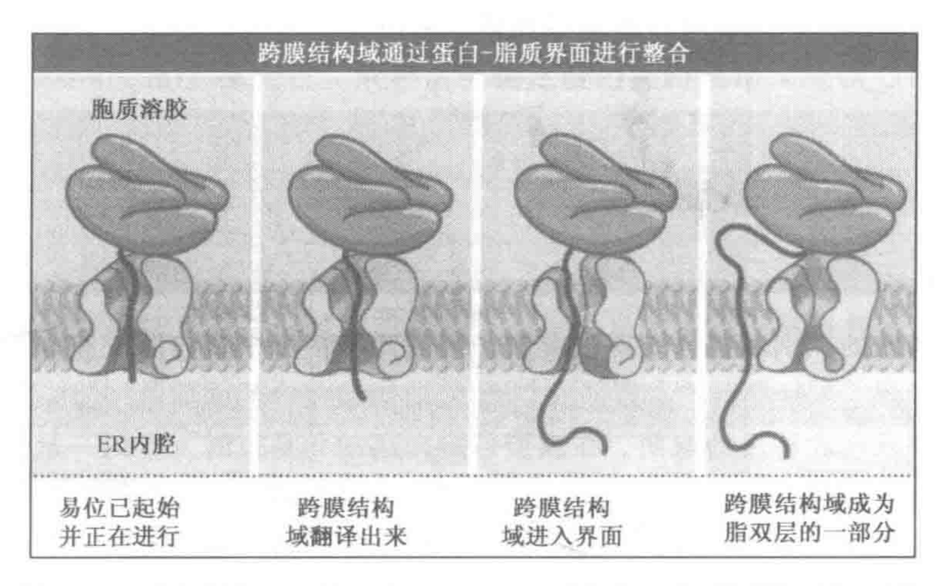


图 3.22 易位通道壁上的一个空隙将正在易位的蛋白质暴露于脂双层，并且使该蛋白质的跨膜结构域被识别和被整合进去。由于跨膜结构域的疏水性，它们更亲和脂性环境，就会从通道移动到脂双层中。

其他信息可以帮助易位子鉴别跨膜结构域。例如，在一些情况下，跨膜结构域的合成引发核糖体与易位子之间的相互作用发生变化，甚至在该结构域从核糖体中伸出来之前。这种变化可以传递信息给易位子，提示跨膜结构域很快就要露出了。跨膜结构域怎样带来核糖体中的这个变化信息，以及传递给易位子的方法还未揭示。新生肽链中邻近实际跨膜结构域的极性元件有时候也是识别所需要的。这提示，至少在某些情况下，识别过程一定涉及更多的因素，不只是跨膜结构域与通道-脂分界面之间的疏水相互作用。

通道-脂分界面似乎提供了航道，在跨膜结构域被识别之后，用来离开通道。然而，跨膜结构域从易位子退出的机制随底物不同而多少有些差别。某些结构域在通道识别它们之后几乎立即离开易位子。在这种情况下，跨膜结构域就首先与 Sec61α 和脂接触，然后只与脂接触，意味着结构域已经通过了分界面进入脂双层了。对于这样的结构域，其整合（integrate）没有别的蛋白质参与只需要 Sec61 复合物。其他的跨膜结构域整合更慢些，在它们被识别后好长时间才离开易位子——有时候甚至被延迟直到翻译终结。这种类型的跨膜结构域，当它们移出通道进入时也与 TRAM 蛋白接触，虽然 TRAM 在这一过程中的作用还不清楚。疏水性可能部分决定一种跨膜结构域是被立即整合还是等到蛋白质合成的晚些时候。更加疏水的结构域可能顺利地移进脂双层，但是那些较少疏水性的结构域可能仍然留在分界面上，需要格外帮助来从侧面退出易位子。一种可能是，TRAM 和其他蛋白质作为跨膜结构域的一种蛋白伴侣（chaperone）（见 3.15 蛋白伴侣帮助新易位的蛋白质折叠），协助疏水性也许仅仅勉强够格的结构域整合。显然，至少跨膜蛋白的一个亚群（subset）能以多种形式存在，它含有给定的被识别的跨膜结构域，被整合进某种周围环境，被传递到其他地方。如 TRAM 这样的蛋白质可以决定什么时候整合这样的结构域。

3.11 跨膜蛋白的方向在它们被整合到膜中时就已经决定了

关键概念

- 蛋白质的跨膜结构域必须在膜中定向。
- 跨膜结构域的整合机制在不同蛋白质中可以明显地不同，对于多次跨膜蛋白更是如此。

跨膜结构域的识别和整合变得很麻烦，因为需要使每个蛋白质按它与 ER 膜的关系来取向（orient）。一些蛋白质必须使它们的 N 结构域在内质网膜的细胞液面，但另外一些蛋白质则要求与此相反的取向。在膜蛋白定向运动和易位时发生的一系列事件完成了蛋白质的定向（orientation）分布。

很容易理解跨膜蛋白的方向性（orientation），蛋白质一旦跨膜就有一个被切除的 N 端信号序列。这些蛋白质启始易位的方式和分泌性蛋白很是一样，其信号序列指导蛋白质定向运动并开始易位。在蛋白质整合过程中，易位继续进行，直到跨膜结构域从核糖体中伸出。结果，蛋白质的 C 端结构域并不易位，而是停留在内质网膜的胞质一侧，如图 3.23 所示。LDL 受体和淀粉样前蛋白（amyloid precursor protein）便属于这类膜蛋白。

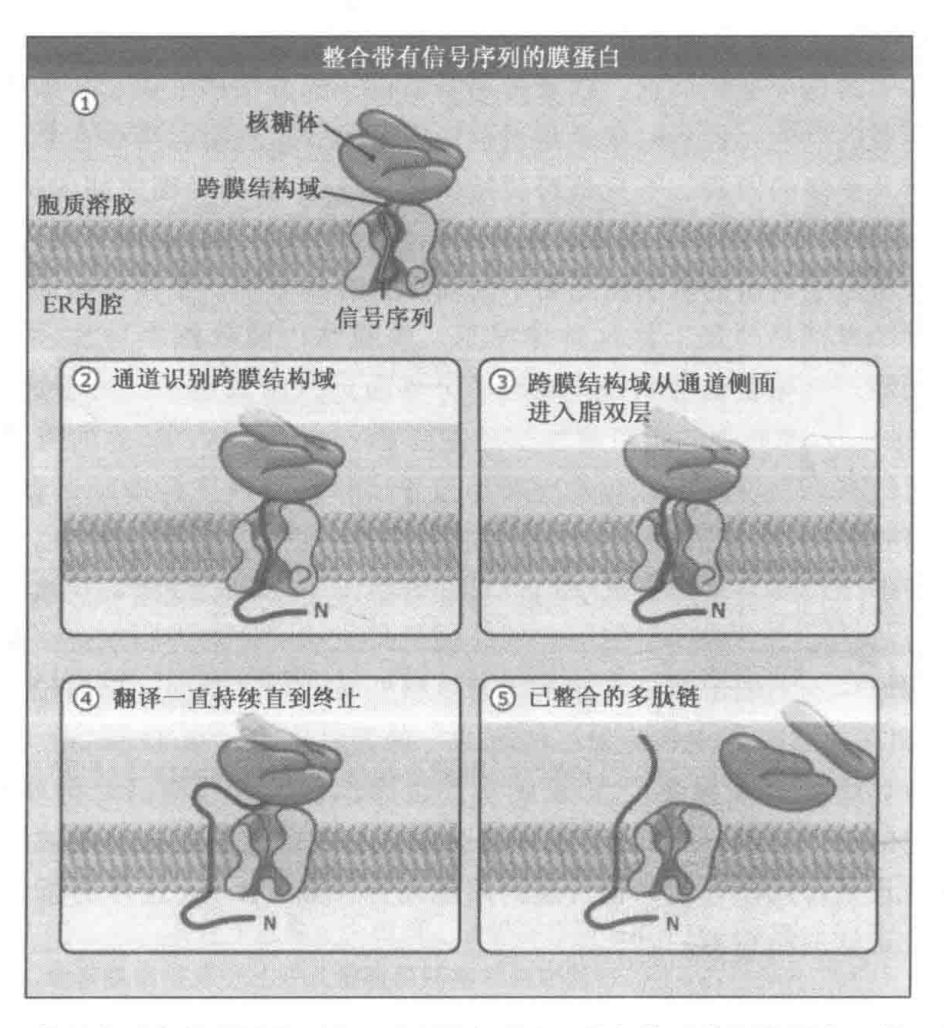


图 3.23 信号序列启始了易位，这一过程进行下去，就好像对分泌性蛋白一样，直到一个跨膜蛋白被翻译和被通道识别。这个过程只以某一个方位来整合蛋白质。

与含有截掉信号序列的跨膜蛋白相比，信号锚定蛋白利用内部的跨膜结构域（即信号锚，the signal anchor）来定位。依赖信号锚定蛋白，跨膜结构域以一种或两种方向插入到膜中。该结构域的多种插入方式怎样决定整个蛋白质的取向，在图 3.24 中可以看到。一些结构域最终将 C 端易位到了 ER 腔内，那些以相反方向插入的结构域，引起 N 端易位到了 ER 腔内。另一类膜蛋白通过其 C 端疏水尾部整合，剩余部分则留在细胞液中。由于这些跨膜结构域位于蛋白质的 C 端，所以它们必须在翻译后被识别。这些蛋白质的整合机制，包括是否这些蛋白质利用了 Sec61 易位通道了解得并不多。

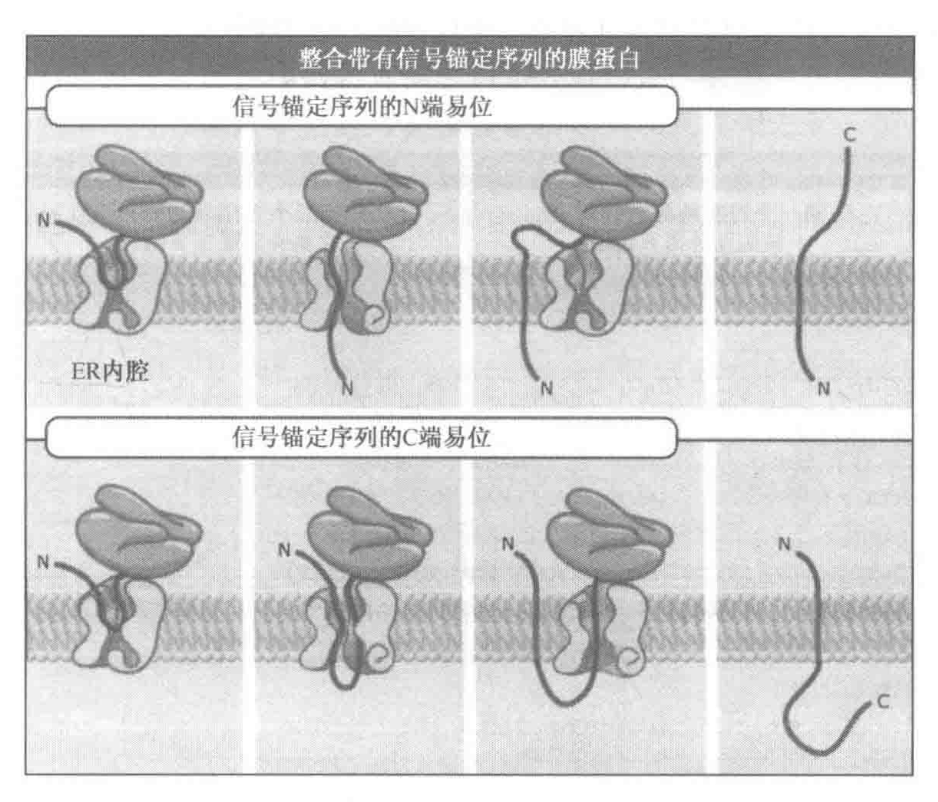


图 3.24 在信号锚定序列开始与通道相互作用之后，信号锚定序列的 N 端或 C 端被易位，是哪一端易位依赖于蛋白质的性质。膜蛋白的不同取向取决于这两种不同的情况。

那么是什么决定了跨膜结构域在易位子中的取向呢？在细菌中，似乎决定因素是跨膜结构域两边带电残基的分布。带电脂类在细菌质膜（脂双层）两页（leaflet）中的不对称分布，可能是跨膜结构域取向机制的实体基础。然而，内质网膜上脂类的分布从电荷看并非不对称，所以这在真核生物中无法解释。此外，一些蛋白质具有多种拓扑结构，这表明蛋白质的取向可能受其他因素影响。总地来说，在真核生物中跨膜结构域是怎样取向的仍然不清楚。

决定多次跨膜蛋白的整合与取向的规则还很难确定。一种最简单的模型为跨膜结构域出现在通道中时，一个接着一个进行整合。整个蛋白质的取向由第一个跨膜结构域的性质决定。这一机制适用于一些情况，但在许多其他情况下，蛋白质的取向过程显然要复杂得多。跨膜结构域并不一定在被通道识别出后就立即被整合，在一定的情况下，易位子显然有能力同时接纳至少两个跨膜结构域。这些结构域可能成对而不是单个进行整合。在它们整合之前，同一个组中的跨膜结构域可能会与其他结构域相互作用而重新定位。因此，在整合一个多次跨膜蛋白的过程中，各事件的顺序依赖于单个蛋白质本身，

蛋白质的取向由蛋白质序列中多个区段的净贡献来决定。

大蛋白质的整合还没有仔细研究过。但是，关于这一过程有一个似乎有道理的模型（图 3.25），是建立在一些已知信息上的，信息是有关在更小的膜蛋白中，易位的启始和跨膜结构域的整合的知识。对核糖体-易位子复合物的电子显微镜观察发现，在核糖体和通道之间有一个明显的大约 15Å 的空隙。通道对跨膜结构域的识别终止了易位过程，允许新生肽链的剩余部分穿过空隙滑入胞质溶胶中。核糖体结构的改变可能使肽链通过空隙更加容易。从核糖体中伸出来的肽链的下一个疏水结构域好像与通道的信号序列/跨膜结构域结合位点有高度的亲和性，因而肽链重新插入到通道中，重新开始易位。易位停止和重新易位的循环一直持续到蛋白质所有的跨膜结构域都被合成并且识别。

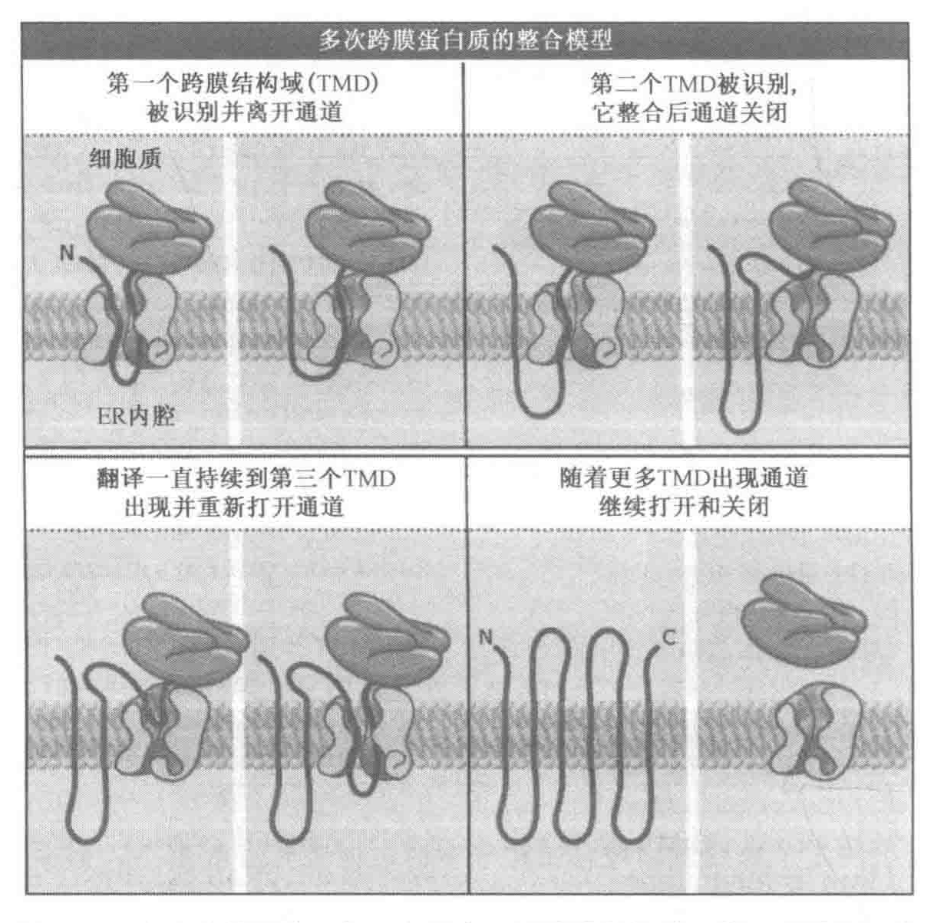


图 3.25　在这个模型中，每一次整合一段跨膜结构域。第一个跨膜结构域的取向决定了整个蛋白质的取向。在图中显示的例子中，信号锚定序列启动了蛋白质的转移，但这一模型也适用于那些将由信号序列引导靶向运输的蛋白质，信号序列事后会被去除。

3.12　信号序列由信号肽酶切除

关键概念

- 当新生肽链易位时，在 ER 腔中通常受到共价修饰。
- 信号肽酶复合物将信号序列切除。

当蛋白质易位进入ER中时，它们常常被共价修饰。有三种修饰是特别普遍的：

- 移除信号序列；
- 连接复杂的碳水化合物结构：***N*-糖基化**（***N*-linked glycosylation**）；
- 连接磷脂：**糖基磷脂酰肌醇**（**glycosylphosphatidylinositol，GPI**）。

几乎每一种蛋白质进入ER中或者整合到ER膜中时都会发生以上三种修饰中的一种或多种。

在这些修饰方式中，信号序列切除的原因是最为明显的。没有切除信号序列可能会在蛋白质易位后干扰蛋白质的折叠，或被认作信号锚而引起细胞需要的蛋白质被分泌或整合到ER膜中。于是，信号序列是“可丢弃的”，在信号序列执行了它们的功能，将新生多肽引导到ER并且通过了它们与易位装置初始的相互作用之后，信号序列就会被去除并弃掉。信号序列的切除对于分泌性蛋白和跨膜蛋白都是很普遍的，信号序列也不作为跨膜蛋白的跨膜结构域。

信号序列的切除由一种五个亚基组成的膜蛋白复合物来执行，这一复合物被称作**信号肽酶复合物**（**signal peptidase complex，SPC**）。其中只有两个亚基具有蛋白水解活性；另外三个亚基可能起调节作用。由于新生多肽是以一种环状的取向插入到易位通道中的，据信当信号序列被SPC切除时，新生多肽的切除位点在ER膜的腔面。

信号序列切除位点随着蛋白质不同而不同，并且大多数情况下由切除位点附近的氨基酸的性质来决定。一般来说，为了让切除发生，位于切除位点N端的残基必须有一个短的侧链，并且切除位点N端的三个氨基酸必须是不带电荷的。对一些蛋白质来说，几个这种位点围绕着真正的切除位点，目前还不清楚真正的位点是如何被选择的。信号序列本身的一些不明确的特性也能够影响切除位点的位置。

信号序列的切除，典型的，在100个或更多个氨基酸合成之后发生，确切的时间随着信号序列的不同而不同。事实上，对一些蛋白质来说切除可能发生得更晚。在信号序列被切除之前，它有时可以影响蛋白质与其他ER因子的相互作用，包括负责新生多肽的修饰与折叠的因子。影响切除时间的信号序列特征还不是很清楚。

在信号序列被切除后，进一步的蛋白质水解事件有时候会处理切下来的信号肽，这一事件由一种被称作信号肽酶（signal peptide peptidase，SPP，它从新生肽链上切除信号肽）的酶复合物执行。信号肽酶只处理被切除的信号肽的一种亚类，这提示该酶的功能远比简单地丢弃“已用过的”信号肽复杂。然而，这种功能确切是什么还不清楚。

3.13 脂性GPI添加到某些易位后的蛋白质上

关键概念

- GPI的添加将一些蛋白质的C端共价地连接到脂双层。

易位到ER中的蛋白质中，数量虽少但不可忽视的一部分蛋白质会被修饰，共价添加上磷脂。通过共价连接到一种膜糖脂（一种膜磷脂，通过其头部基团连接一种糖结构）上，该膜糖脂叫做糖基磷脂酰肌醇（glycosylphosphatidylinositol，GPI），易位后的蛋白质就能被束缚到脂双层膜的腔面上。结果，那些未完全易位的蛋白质仍然能与膜相联结，而跨膜蛋白会有一个另外的连接点。蛋白质可以通过添加GPI而不是通过整

合连接到膜上的原因尚不清楚。已有证据表明，添加 GPI 会使蛋白质带上标记从而经历特殊的胞内转运途径（intracellular transport pathway），例如，蛋白质被运到极性细胞的顶面或者运到细胞膜凹槽或脂堆（lipid raft）上。通过脂连接到膜上的蛋白质在膜平面上比膜内在蛋白有更大的流动性，因为在膜中脂类比蛋白质扩散得更快。另外，膜内在蛋白不能轻易地从膜中释放出来，而通过 GPI 连接（GPI linkage）附着到膜上的蛋白质能够用酶切除锚而被释放出来。因此，GPI 连接允许蛋白质在应答信号刺激时从膜上释放出来。

GPI 是一种精细的结构，必须在被添加到蛋白质上之前合成。如图 3.26 所示，GPI 的合成在 ER 膜的胞质页（cytosolic leaflet）上开始，伴随着膜磷脂 PI（phosphatidylinositol）添加到 *N*-乙酰氨基葡萄糖（*N*-acetylglucosamine，GlcNAc）上。通过随后的一系列反应，然后 GlcNAc-PI 被去乙酰化并且再添加三个甘露糖（mannose）。每一个甘露糖上面加上一个磷酸乙醇胺（phosphoethanolamine）产生了最终的 GPI 底物。在这一系列反应中的某些点，中间物之一跨膜移动，以便最终的产物是在腔页（lumenal leaflet）中，在这里中间物被添加到已易位的蛋白质上。定位的膜侧面的改变也许是因易位酶（translocase）或"翻转酶"（flippase）的作用。然而，这种翻转酶还有待证实，并且该酶在其中起作用的 GPI 的合成步骤还不知道。

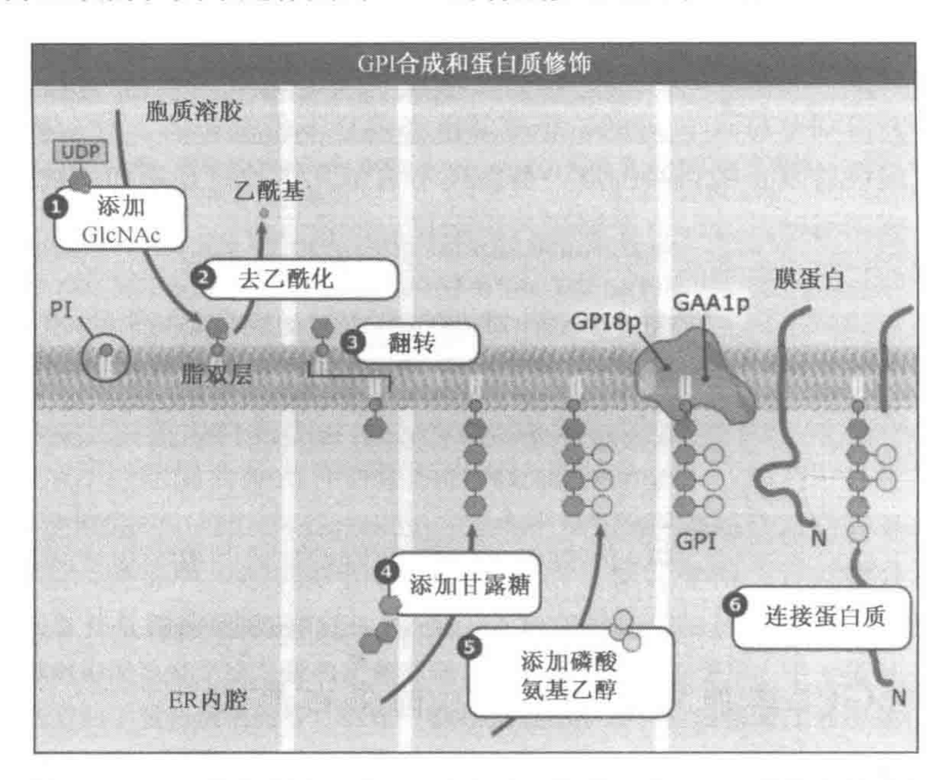


图 3.26 GPI 的合成以一系列步骤完成。前面几步在 ER 膜的胞质面上发生，后几步在 ER 的腔面进行。合成结束后，GPI 就通过一个在靠近 C 端处劈开蛋白质的反应与该蛋白质共价结合。GPI 修饰使蛋白质系到了膜上，GlcNAc 代表 *N*-乙酰氨基葡萄糖。

GPI 添加需要识别作为底物的新生链，以及 GPI 的组成部分转移到蛋白质的受体位点。GPI 添加使用的信号是一个小的可改变长度的 C 端疏水结构域（一般有 10～30 个残基）。和 N 端信号序列一样，不同的蛋白质中 GPI 信号的序列是不一样的，并且在

蛋白质之间可以互换。当添加 GPI 时，先是 GPI 信号从蛋白质上移除，GPI 部分被添加到新的 C 端残基上，这被称为 omega（ω）位点。这样，GPI 信号和信号序列一样是发挥完功能后就被除去的。

一个至少由两个组分，Gaa1p 和 Gpi8p，构成的膜内在蛋白（integral membrane protein），催化 GPI 的添加。该反应最可能的机制涉及一个包括两步的转酰胺基作用（transamidation reaction），如图 3.27 所示。第一步，酶与 omega（ω）位点形成一种共价中间物，导致 C 端肽段由蛋白质的其余部分切除下来。然后 GPI 端部的磷酸乙醇胺残基被酶带来与新生蛋白紧密接触，添加到 omega（ω）位点，形成了 GPI 连接的蛋白并将酶释放。此过程是否需要 ATP 或 GTP，是否 GPI 的添加需要 GPI 信号首先被整合进膜双层，这些还不清楚。

虽然 GPI 的添加由转酰胺基酶催化而不是由蛋白酶催化，信号序列的识别和切除与 GPI 信号的识别和切除之间的相似性还是令人惊讶的。信号序列和 GPI 信号之间非常相似，以至于如果它们位于蛋白质的同一个位置，它们常常行使相同的功能。在一些情况下，一个 N 端信号序列，如果它被融合到分泌性蛋白的 C 端，能正常地作为一种 GPI 信号起作用。这两种信号都作为跨膜结构域被识别，并且如果位于一个蛋白质的中间的话，会被整合进膜双层。这两种信号的切除位点也相似。这些相似性暗示了一种令人感兴趣的可能性，即这两种信号的识别可能涉及某些同样的蛋白质。

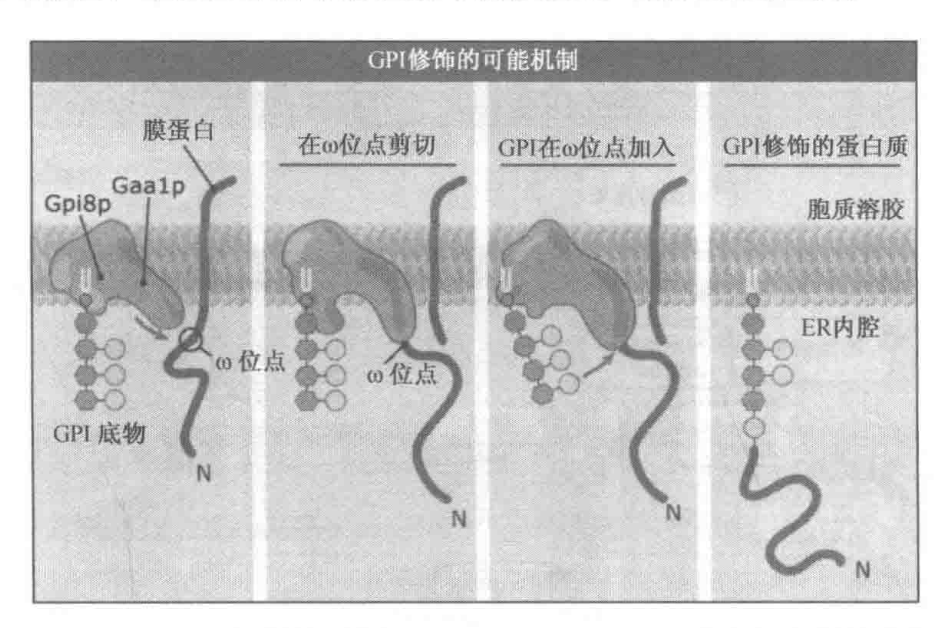


图 3.27　GPI 添加到蛋白质上分两步进行。在这一反应中起作用的酶复合物中的一种蛋白质首先在某个特定位点将底物蛋白切开，这个过程中与底物蛋白形成共价联结。这种联结随后被 GPI 的磷酸乙醇胺基团之一取代，产生了 GPI 修饰的蛋白。

3.14　许多蛋白质在易位时发生糖基化

关键概念

- 许多蛋白质在易位进入 ER 时，经寡糖基转移酶催化进行 *N*-连接糖基化。

许多蛋白质被易位进入 ER 时，都被大的糖复合物共价修饰。这种修饰非常普遍：细胞中超过半数的分泌性蛋白和膜蛋白都会添加糖，许多蛋白质的多肽链中多个不同的位置都受到修饰。由于该过程发生在天（门）冬酰胺（*N*）残基上，常常被称为 *N*-连接的糖基化。

曾经提出过糖基化的许多作用。但验证它们很困难，因为许多正常地糖基化的蛋白质，当糖基化被阻止后并没有明显的功能缺失。然而，在一些情况下，糖基化的一种作用得到了证实。当蛋白质还在 ER 中时，糖基修饰协助蛋白质折叠或降解。在 ER 以外，这些修饰作用的功能还不清楚。一些证据显示糖基化的改变可能作为一种机制用于改变蛋白质的功能。例如，滤泡刺激的激素（follicle-stimulating hormone）当自身的糖基化改变时，其分泌及活性会随之发生改变。在其他情况下，糖类可以增加蛋白质的溶解性，或保护蛋白质不受胞外蛋白酶的降解。

在 *N*-连接糖基化过程中，一个预先形成的大中间物作为一个单位被添加到 ER 腔中的底物上。图 3.28 描述了该过程。该中间物的合成在膜的胞质侧小页（cytosolic leaflet）上开始，两个 GlcNAc 和五个甘露糖残基被添加到一个较小的膜磷脂——磷酸多萜醇（dolichosphate）的头部基团上。这一前体物随后由一个尚未确定的翻转酶转移到膜的腔面小叶上。在这里，又有四个甘露糖残基添加上去，结果形成三个甘露糖分枝。最后，在这三个分枝的其中一个分枝的末端添加三个葡萄糖残基，形成了为糖基化作用提供糖基的分子。

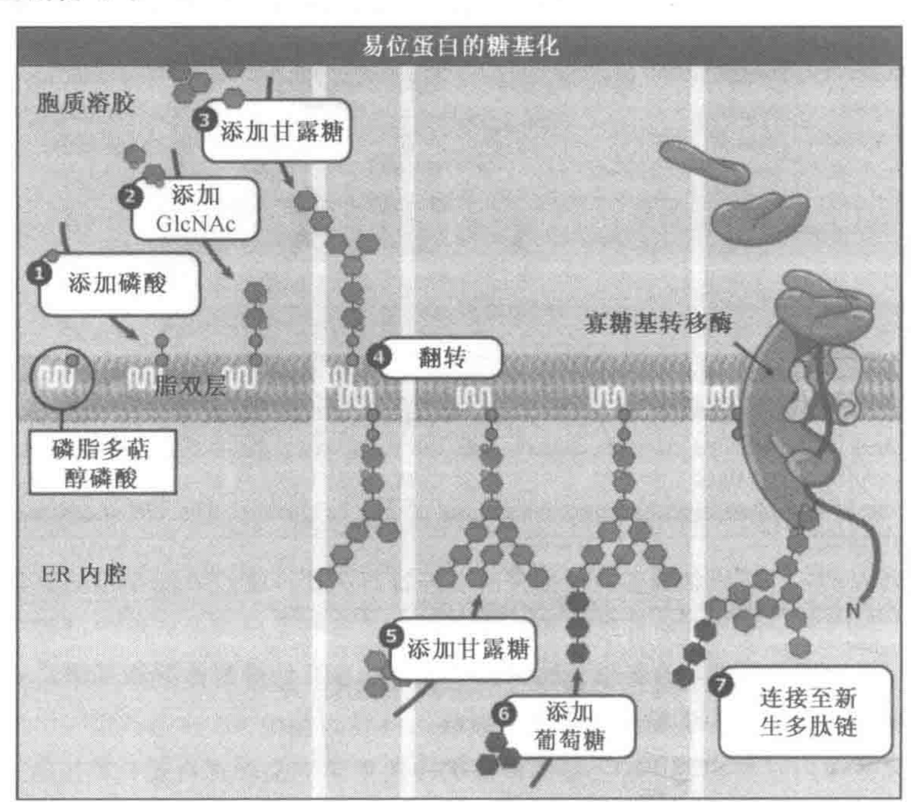


图 3.28 在一系列步骤中，在磷脂多萜醇磷酸上合成了一个精巧的碳水化合物结构。合成在 ER 膜的胞质面上开始，但在其腔面完成。生成的整个寡糖链结构被寡糖基转移酶转移到正在易位的蛋白质上。这一修饰发生在天（门）冬酰胺上，它看来是位于特定序列中。

分枝的糖类结构从磷酸多萜醇上转移到底物是在蛋白质易位时发生的。转移被多亚基复合物**寡糖基转移酶（oligosaccharyl-transferase，OST）**催化。两种OST亚基，内质网核糖体结合糖蛋白Ⅰ（ribophorin Ⅰ）和Ⅱ，横跨ER膜并可能与停泊在ER上的核糖体相互作用，将OST复合物置于通道附近。当天（门）冬酰胺残基后面的氨基酸为脯氨酸之外的任何氨基酸，并且后面是丝氨酸或苏氨酸（N-X-S/T）时，OST就修饰该天（门）冬酰胺残基。在相应位点从通道中暴露出来后很短时间糖基化（作用）就会发生，在糖基化能够发生之前，只需要有10～12个氨基酸已经进入腔中。对位点的识别是非常高效的：在细胞中，大约90%的潜在位点被用到，但另外一些位点则从来不被用到。在不同条件下，某个特殊蛋白质的糖基化程度可能会变化。在蛋白质最初被糖基化后，对寡糖结构的修饰在ER和Golgi体中不同的位点发生，这些修饰作用包括移除一些糖残基和添加另外一些糖残基。

3.15 分子伴侣帮助新易位的蛋白质折叠

关键概念

- 分子伴侣在腔中与蛋白质联结并协助它们折叠。

当新生多肽被易位并且修饰时，它们也开始折叠。大量的新易位的蛋白质源源不断地到来，在ER腔中折叠是一项主要的活动。由于错误折叠的蛋白质对细胞有很大的危害，ER的一个首要任务就是要保证只有正确折叠的蛋白质能够进入后面的分泌途径。为了做到这点，ER有一个非常活跃的质量控制系统，该系统识别未折叠或错误折叠的蛋白质，给它们机会正确折叠或者启动它们解体。

在ER中折叠的蛋白质同那些在胞质溶胶中折叠的蛋白质面对着同样的问题。蛋白质的折叠是由疏水相互作用驱动的：多肽的疏水结构域倾向于彼此连接而不是暴露在它们的水性环境中（见MBIO：3-0003）。然而，疏水结构域可能不正确地连接，导致产生错误折叠的蛋白质，或者可能引起与其他蛋白质的聚集。在体内，分子伴侣（molecular chaperone）通过允许蛋白质在受到保护的环境中反复折叠直到折叠成正确的形式，以及区分正确折叠与错误折叠来推进折叠过程的完成。分子伴侣在ER中非常活跃，形成质量控制系统的基础。只要蛋白质与分子伴侣相联结，它就不能从ER中出来转移到Golgi体。

ER中许多最通用的蛋白伴侣（chaperone）都与参与胞质溶胶中蛋白质折叠的蛋白伴侣有关系。这些腔内蛋白伴侣中最具有代表性的就是hsp70家族成员BiP。BiP是ER腔中含量最多的蛋白质，并且在蛋白质折叠期间很早就与许多蛋白质相互作用。

由于疏水结构域常常埋在球蛋白中心，蛋白质上暴露的疏水斑块的存在是强烈的信号，表明该蛋白质还没有完成折叠。这些区段提示BiP去结合到新生肽链上。通过ATP水解驱动的连续不断的结合/释放循环，BiP保护新生蛋白不会聚集，这样给它们多次机会去形成正确的构象。BiP的分子伴侣活性受到两种蛋白质的影响，一个是刺激ATP被BiP水解的附属蛋白，另一个是那些促使ADP替换ATP的蛋白质。因此，可以设想蛋白质重新折叠的速度能够应细胞的需求而加快。在蛋白质已经将疏水部分埋藏而折叠成致密的结构后，就再也不与BiP联结了，如图3.29所示。ER腔中极高的BiP

浓度保证了它成为大多数新生多肽遇到的最初的蛋白伴侣之一，当一个蛋白质试图折叠的时候，似乎总是有 BiP 分子在近旁。由于 BiP 在折叠过程一开始的时候就起作用，它在协助蛋白质折叠中起着非常全面的作用。

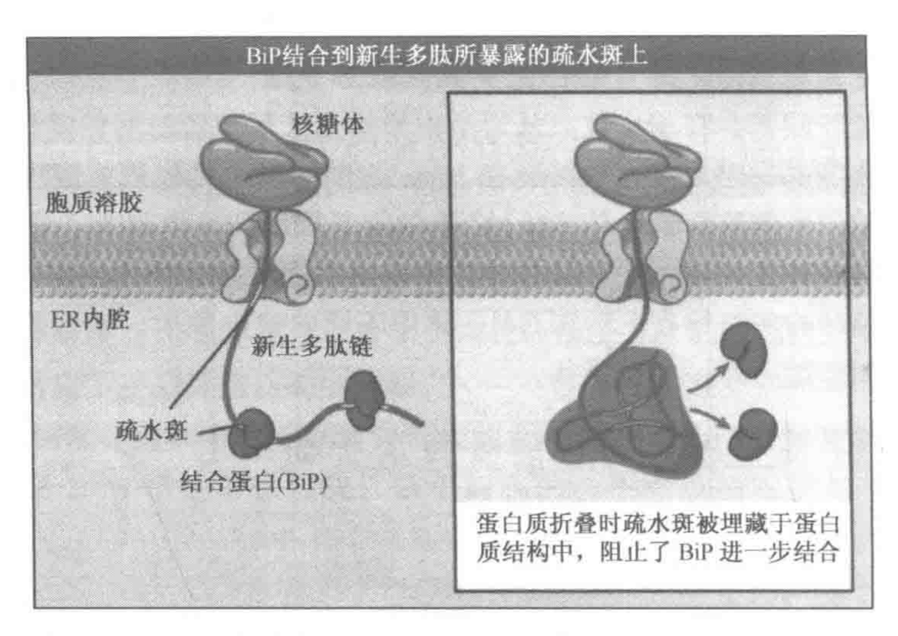


图 3.29 BiP 结合到刚被易位的蛋白质所暴露的疏水斑（hydrophobic patch）上。在蛋白质折叠后，疏水斑就会埋藏于蛋白质结构中，BiP 不再能接近它。

另一种共通的腔内蛋白伴侣是 Grp94，它在胞质溶胶中也有相似物，该蛋白质是 hsp90 家族的成员。尽管 Grp94 在 ER 腔中也很丰富，但不像 BiP，它倾向于结合到已经部分折叠的蛋白质上而不是刚刚出现在腔中完全没有折叠的蛋白质上。Grp94 与之相互作用的底物比 BiP 的少，并且它识别的蛋白质的性质也不清楚。据推测，Grp94 的功能不只是在 BiP 和其他蛋白伴侣协助了蛋白质普遍的折叠之后，完善蛋白质的折叠，Grp94 还有更多的功能。Grp94 的这种活性揭示了新生蛋白的折叠过程中，质量控制系统在多水平上行动。

3.16 蛋白二硫键异构酶在蛋白质折叠时保障形成正确的二硫键

关键概念

- 蛋白二硫键异构酶催化二硫键的形成和在 ER 中的重新分布。

BiP 和 Grp94 在胞质溶胶中有相似物，而 ER 的腔中也需要专门化的蛋白伴侣系统。当需要时蛋白质能够形成二硫键是尤其重要的。二硫键的形成是氧化环境中的结果，这种氧化环境存在于 ER 的腔中，也存在于胞外环境中。二硫键在蛋白质折叠时的半胱氨酸残基之间（尽管二硫键有时也产生于蛋白质之间）形成。该反应是由一类称作**蛋白二硫键异构酶（protein disulfide isomerase，PDI）**催化发生的。PDI 并不总是形成正确的二硫键，也常常会在蛋白质折叠时形成不当的二硫键，如图 3.30 所示。这会使蛋白质陷入不正确的构象，或是如果不能够将键断裂和进行重排（rearrangement）的话，蛋白质会聚集。PDI 通过催化二硫键重新排列和形成解决了这一问题。PDI 及其他

巯基异构酶使新生蛋白质具有揉曲性，可以重新折叠而不被二硫键制约。

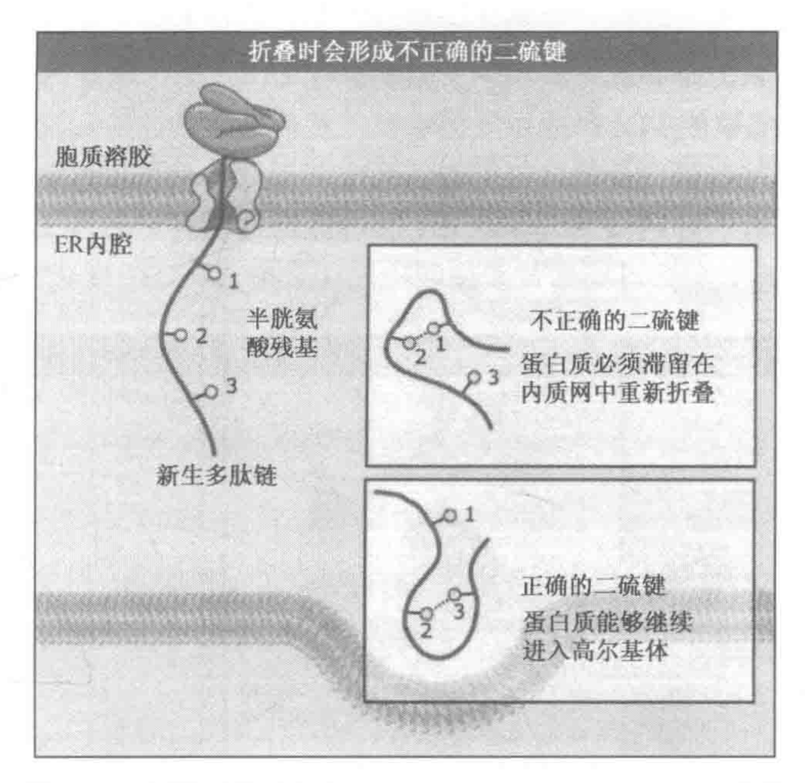


图 3.30 当被易位的蛋白质试图折叠时可能会形成不正确的二硫键。不正确的键必须被检测到，并在蛋白质被允许进入高尔基体之前必须形成正确的二硫键。

在其他蛋白质上，PDI 催化二硫键形成是靠它自身活性位点上的半胱氨酸残基来实现的，如图 3.31 所示。二硫键的形成是一种氧化还原反应，有正在折叠的蛋白质上的

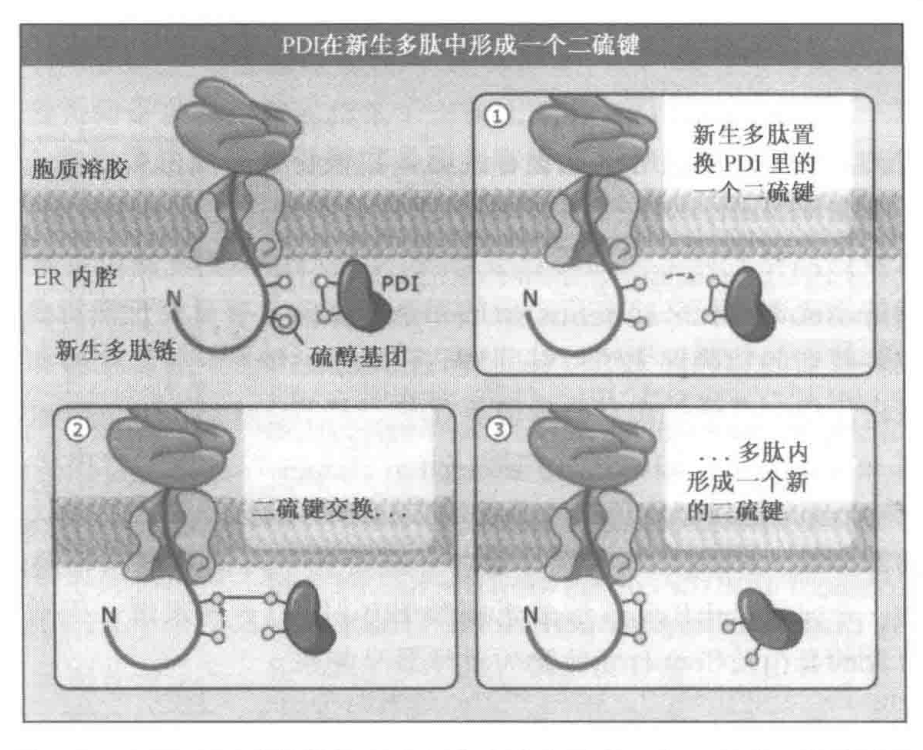


图 3.31 PDI 的二硫键被用于在新生多肽中形成一个二硫键。然后酶又在 PDI 中催化生成新的二硫键，使得 PDI 能够反复作用。

半胱氨酸和PDI本身的半胱氨酸之间的电子交换。PDI要能够参与催化，它的半胱氨酸必须在氧化状态（作为二硫键）开始这一反应，并且必须有一个系统在反应后重新将它们氧化。起初人们认为是谷胱甘肽小分子重新氧化PDI。氧化状态的这个小分子被选择送入ER腔中，它能够使PDI保持在氧化状态。然而最近已经发现，甚至在没有谷胱甘肽的情况下，至少某些蛋白质的二硫键能够形成并重新排列。虽然谷胱甘肽可能起着作用，现在看来似乎有一种叫做Erolp的ER蛋白负责最初的PDI氧化。在图3.32中描述了这一反应。Erolp本身可能被黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）氧化。

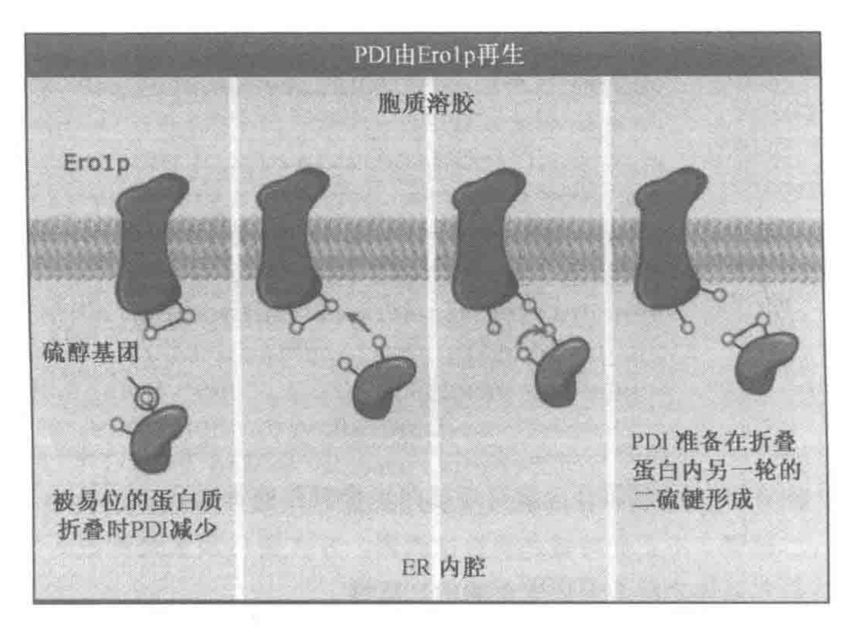


图3.32　Erol蛋白含有一个二硫键用于二硫键置换反应从而产生PDI。反应过后，Erolp中的二硫键被另一步反应重新生成，该反应不涉及PDI。

如图3.33所示，PDI采用了不同的机制来对错误折叠的蛋白质中存在的二硫键进行异构。在这一反应中，PDI活性位点上的一个半胱氨酸残基与错误折叠的蛋白质之间形成一个短暂的二硫键。当这一二硫键存在时，错误折叠的蛋白质能够重新折叠，尽管该蛋白质还结合在PDI上。如果正在折叠的蛋白质找到了一种构象，可能形成另一个二硫键，那么蛋白质与PDI之间的键就会断裂。目前还不清楚PDI是如何感知一个蛋白质具有正确的二硫键并且终止与蛋白质的相互作用的。有可能正确折叠的蛋白质内多肽链的紧密包装使它的二硫键无法接触到酶。PDI除了作为一种氧化酶和异构酶外，还能作为一种蛋白伴侣，其活性由其自身的氧化状态调节。

虽然PDI是被描述最多的巯基异构酶，并且在不同种类的细胞中必不可少地广泛表达，ER腔内许多其他以氧化还原为基础的蛋白伴侣也已经得到了确认，有可能这些蛋白伴侣中的部分或大多数是细胞特异性的，或者甚至可能是底物特异性的。有趣的是，该家族的一个成员是ERdj5，该酶也刺激BiP对ATP的水解。因此，可能ERdj5帮助将BiP介导的蛋白质折叠与二硫键的重排联结起来。

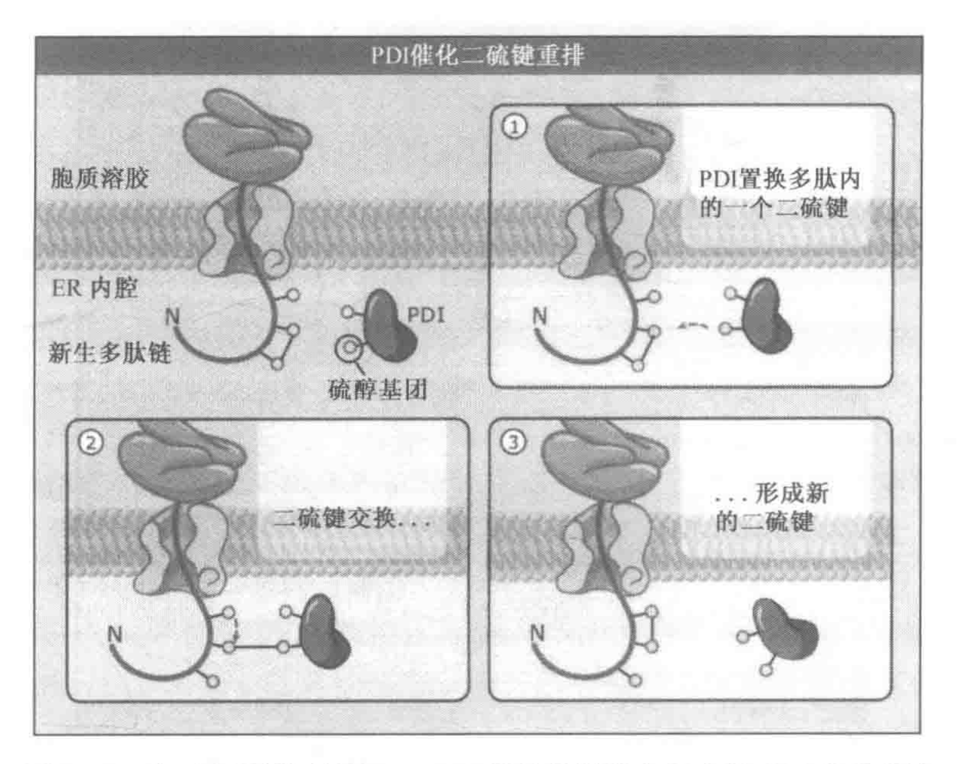


图 3.33　当蛋白质试图折叠时，PDI能够检测蛋白质中没有正确形成的二硫键。通过与PDI之间形成键使不正确的二硫键移除，直到蛋白质中能够通过二硫键置换形成另一个二硫键时，蛋白质才重新折叠。要注意的是，蛋白质是当它结合到PDI上时折叠的。

3.17　钙联结蛋白/钙网织蛋白陪伴系统识别糖类修饰

关键概念

- 钙联结蛋白和钙网织蛋白通过由添加和移除葡萄糖控制的、重复的陪伴循环来护卫糖蛋白。

ER中另一种独特的质量控制形式是凝集素介导的陪伴（lectins-mediated chaperoning）。在这一通路中，糖蛋白与ER腔中的糖结合蛋白（lectin，凝集素）相结合。这些最普通的凝集素以及膜内在蛋白钙联结蛋白（calnexin）和它的腔内同系物钙网织蛋白（calreticulin）可能本身并不是蛋白伴侣。而是它们似乎能够将新生糖蛋白带去与PDI家族成员和蛋白伴侣ERp57接触。于是，易位后的蛋白质的糖基化（作用）为蛋白质的质量控制提供了一种额外的切入点。虽然钙联结蛋白和钙网织蛋白识别稍微不同的糖蛋白群，它们功能相似，在这里将只描述钙联结蛋白。

图3.34显示了蛋白质进入钙联结蛋白循环受到特定的糖结构修饰的控制，当蛋白质易位时糖结构被添加上去（见3.14 许多蛋白质在易位时发生糖基化）。当这一结构最初被添加时，它的几个分支之一的末端有三个葡萄糖残基。两个远端的葡萄糖残基被迅速移除（分别被糖苷酶Ⅰ和Ⅱ），只留下最近的葡萄糖。然后，钙联结蛋白与这一形式的蛋白质连结，带它与ERp57接触，ERp57催化二硫键形成或重排，允许蛋白质折叠或重新折叠。

在ERp57介导的重新折叠之后，最后的葡萄糖被糖苷酶Ⅱ从蛋白质上除去。未糖

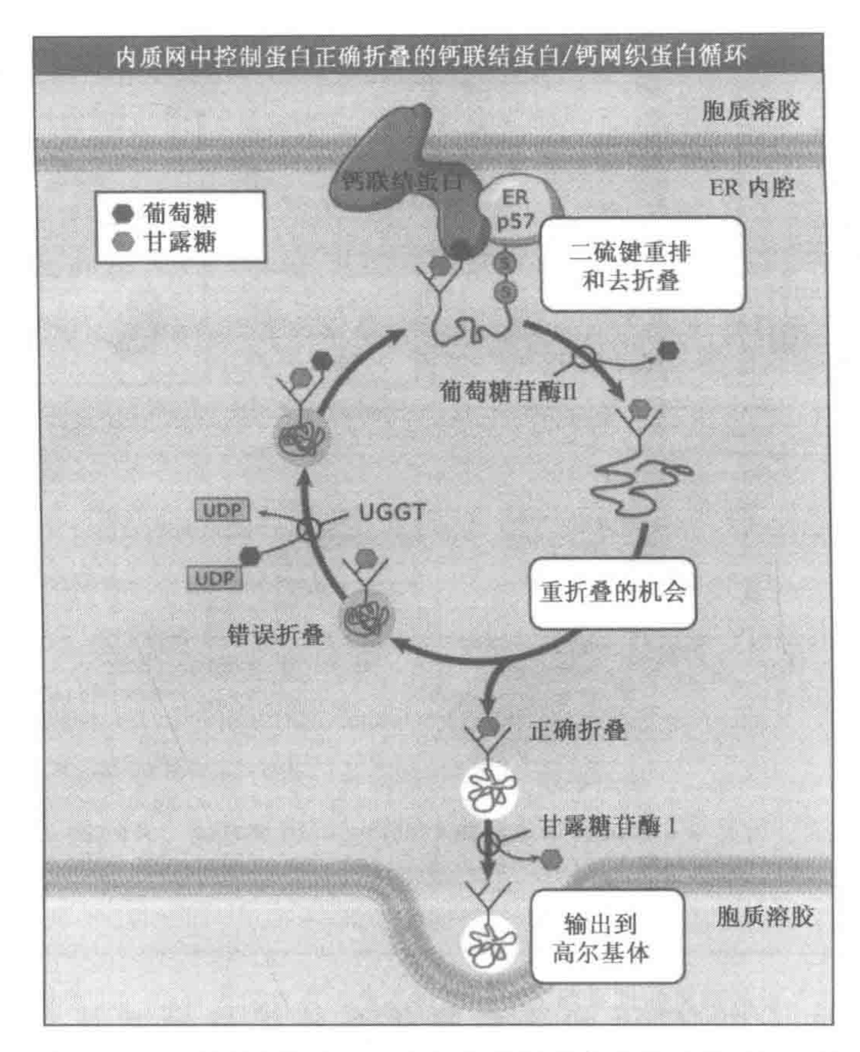


图 3.34　*N*- 连接寡糖上单个葡萄糖分子的存在给了错误折叠的蛋白质另一个机会，即通过结合到钙联结蛋白和钙网织蛋白上来折叠。UGGT 酶将葡萄糖残基添加到缺乏葡萄糖的错误折叠的蛋白质上，因此，UGGT 必须能够区分错误折叠的蛋白质与正确折叠的蛋白质。

基化的蛋白质不再是钙联结蛋白底物。但是，如果在单次钙联结蛋白循环之后蛋白质正确折叠失败，则一个葡萄糖可以被 ER 腔中的叫做 UGGT（UDP-glucose-glucoprotein）的酶重新添加上去。这一添加使错误折叠的蛋白质重又结合到钙联结蛋白上并重复这个过程。这样，一个蛋白质可以多次去除和添加葡萄糖，直到它得到正确的折叠形式。在这个循环中 UGGT 发挥了关键的作用，因为它是敏感元件，能区分正确折叠的和那些错误折叠的蛋白质。UGGT 识别一组暴露的疏水残基，并能利用葡萄糖进行重新糖基化，这些葡萄糖距离被 UGGT 识别为未折叠的实际区段相当远。

钙联结蛋白循环被很好地描述了，而糖蛋白折叠的整个生理重要性，以及特别地通过这种循环进行的重新折叠还不清楚。事实上，带有钙联结蛋白基因缺陷的小鼠很好地活到了成年，在胚胎发育期间，钙联结蛋白失效是致死的，这种致死性似乎更多地是钙网织蛋白在调节 ER 的钙浓度中的作用造成的（见 3.24ER 按其形态和功能可以再进行细分），而不是由于钙联结蛋白在蛋白质折叠中的作用。有可能存在于 ER 腔中的多伴侣系统（multiple chaperone system）的作用有部分重叠，以便任何单个蛋白伴侣的缺

失能被细胞耐受。

3.18 蛋白质组装成复合物的过程受到监控

关键概念

- **还没有组装成复合物的亚基通过与蛋白伴侣的相互作用被留在ER中。**

除了折叠以外，一些蛋白质必须组装成复合物。大多数多聚体分泌性蛋白或膜蛋白都在ER中组装，这给质量控制过程又增添了额外的复杂性。影响蛋白质折叠的同类分子之间的相互作用：疏水相互作用、二硫键化和离子相互作用，也会驱动寡聚化发生。结果，协助蛋白质折叠的同一种ER机构（machinery）也监视着蛋白质的组装。没有组装时，许多蛋白质与特异的蛋白伴侣相联系而被阻留在ER内部。例如，免疫球蛋白的重链在与功能性轻链分子相连之前会一直结合在BiP上。这就保证了没有组装好的重链留在ER中，只有完全组装好的抗体才能出ER转向高尔基体。**巯基介导的保留（thiol-mediated retention）**也用于将未组装的蛋白质留在ER中。在寡聚体中形成分子间二硫键的特异性半胱氨酸残基也作为某些蛋白质组装状态的指征受到了监视。人们认为如果寡聚化没有发生，这些半胱氨酸就会与PDI家族成员之间形成分子间二硫键，导致没有完全组装好的蛋白质滞留在ER中。最终，某些蛋白质在它们的初级结构上带有独特的ER滞留信号。当蛋白质正确组装时，这些信号就会被掩盖起来，从而使它们能够离开ER。例如，T细胞受体α链的跨膜结构域除非成为完全组装好的多聚受体的一部分，否则就会停留在ER中。

除了已经描述过的这些过程之外，还有其他更多的底物特异性质量控制形式在ER腔中工作。例如，脯氨酰-4-羟化酶（P4H）和Hsp47特异性地参与了前胶原（procollagen）的折叠和组装，折叠成胶原家族成员特有的三螺旋结构（见15.3 *胶原蛋白支撑着组织结构*）。底物特异性质量控制蛋白常常以目前还不清楚的途径协助蛋白质的折叠和分泌。

新生蛋白在其成熟与组装过程中常常与不止一种陪伴系统（chaperoning system）相互作用。由于蛋白质上的空间有限，每一种反应只能瞬间进行。结果，蛋白质在离开ER之前可能要在各个陪伴系统之间穿梭。与蛋白质相互作用的特定因子，以及蛋白质与那些因子相互作用的顺序随着底物的不同而不同，可能依赖于氨基酸序列。例如，在N端有糖基化位点的蛋白质常常首先与钙联结蛋白或钙网织蛋白相互作用。那些糖基化位点在序列中靠后的蛋白质，可能在进入钙联结蛋白/钙网织蛋白途径之前改为与BiP相互作用。因为一些不同的质量控制体系能够引导同一个蛋白质的折叠，从而阻止蛋白质进入单一的途径——例如，可以通过删除糖基化位点或删除半胱氨酸残基——故通常并不妨碍蛋白质被折叠和分泌出去。

尽管许多在ER中介导质量控制的蛋白质已经被鉴定，但是它们作用的分子机制大多仍不知道。目前清楚的是它们能够辨认出没有正确折叠的蛋白质，但不清楚被辨认的蛋白质的性质。未折叠的蛋白质看来很容易辨认，但是错误折叠的蛋白质是怎样从那些正确折叠的蛋白质中辨别出来的？特别是，UGGT是怎样做这种辨别的？怎样将正确寡聚体化的蛋白质与不恰当地聚集的蛋白质区别开呢？在完全明白ER的工作中质量控

制如何运作之前，回答这些问题及类似的问题是必要的。

3.19 ER中错误折叠的蛋白质最终被返回胞质溶胶中降解

关键概念

- 易位的蛋白质能够被输出到细胞液中，在这里它们被泛素化并被蛋白酶体降解——这是一个与ER相联系的降解过程。
- 蛋白质通过逆行易位过程返回到细胞液中，对这一过程的了解还不像对蛋白质易位进入ER的过程那样清楚。

ER质量控制机构（machinety）保证只有正确折叠的分泌性蛋白和跨膜蛋白才能够被运出，而未折叠的蛋白质则被蛋白伴侣挡在ER中给予机会正确折叠。可是那些从来没有达到正确构象的蛋白质怎么办呢？这些没有能力折叠的蛋白质必须以某种方式除掉。为解决这个问题，细胞用了一种逆行易位（retrograde translocation）的方法，有时候也称作反向易位（dislocation）或逆易位（retrotranslocation），将错误折叠的蛋白质送回到细胞液中。在那里它们与泛素结合并被蛋白酶体（proteasome）（一个大蛋白酶复合物）降解（见BCHM：3-0001）。这一降解途径被称作**ER相关的降解（ER-associated degradation，ERAD）**。

ERAD途径的发现开始于对ER中错误折叠的蛋白质被降解而不允许积聚的现象的认识。起初，推测这一降解过程仅在ER中发生，但是尽管费了很大力气还是没有在ER中发现任何蛋白酶。而是开始有了证据，显示蛋白质是在细胞液中被蛋白酶体降解的。首先，蛋白酶体的化学抑制剂阻断了新合成的膜内在蛋白（CFTR，或囊性纤维化跨膜传导调节蛋白）的降解。这项观察提示蛋白质降解前必须被从ER运出。后来，实验显示对蛋白酶体的抑制能够使那些已经完全易位的蛋白质在细胞液中积聚。

蛋白质是如何提交给ERAD的呢？蛋白质上没有能引导蛋白质到达ERAD途径的信号序列。倒是ERAD机构必须识别那些物理性质，这些物理性质最终能将错误折叠的蛋白质与正确折叠的蛋白质或暂时没有折叠的蛋白质区别开来。比如，使蛋白质最终折叠后的结构不稳定性突变会导致蛋白质被降解。事实上，质量控制机构可能识别出突变的蛋白质并将其作为ERAD的底物，即使该突变对蛋白质的功能影响很小。甚至那些没有可辨认的折叠缺陷的蛋白质也可能被送到ERAD途径中，虽然一定有某种让细胞识别的信号，但是还没有被揭示出来。图3.35显示了ERAD总的途径。提交蛋白质到ERAD途径的第一步是对错误折叠形式的识别。尽管我们还不清楚这一识别是怎样发生的，但蛋白伴侣可能有显著的作用。然而，对于ERAD途径，与蛋白伴侣的联系不可能是唯一的要求，因为蛋白伴侣协助了所有的新生蛋白折叠。而是，逆行易位的信号可能跟蛋白质与蛋白伴侣相联结的时间长度有关。蛋白伴侣会一直与蛋白质相互作用直到蛋白质正确折叠为止，所以，一个不能正确折叠的蛋白质与蛋白伴侣相联结的时间就会更长。然而，总体上还不清楚蛋白质与蛋白伴侣联结时间的延长是如何被感知到的。以最终没有正确折叠的糖蛋白为例，α-甘露糖苷酶Ⅰ将蛋白质上糖类中的甘露糖修剪掉，从而将其定向运送到降解途径。但目前还不清楚是什么将蛋白质提交去进行这种酶对糖类的修剪的。

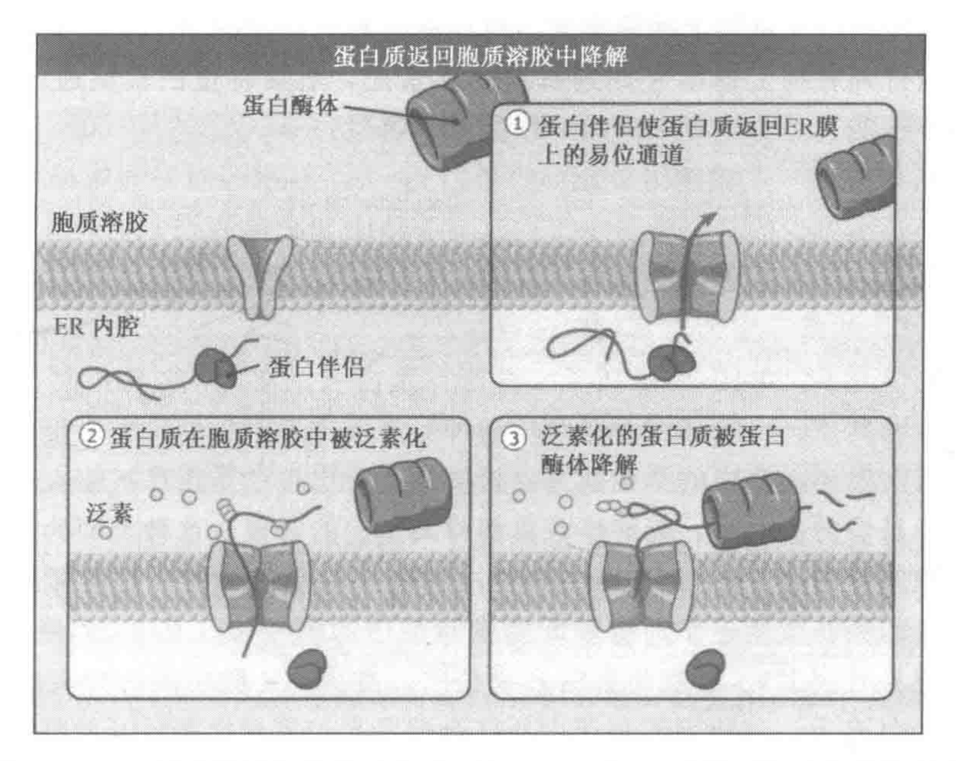


图 3.35　ER 腔中错误折叠的蛋白质最终会返回到 ER 膜从而经过逆行易位转到胞质中。在这里它们被蛋白酶体降解。ER 腔中的蛋白伴侣可能在蛋白质的重新定向运动中起了作用，因为错误折叠的蛋白质必须与其相连。

在蛋白质已经被提交到逆行易位中后，该蛋白质必须要穿过 ER 膜。多种遗传和生化证据强调 Sec6lp 复合物是逆行易位的通道。然而，似乎还有一些逆行易位不依赖于 Sec6l 的例子，这一通道的确定性或者甚至是否可能有一些性质不同的途径，每一种途径针对一定类别的错误折叠蛋白，这一切还不清楚。无论如何，通道的确定跟易位底物所面临的挑战一样，也是 ERAD 底物面对的问题。对要运出的蛋白质来说，首先它必须被带到通道，通道必须打开着，然后蛋白质必须通过通道被移动到胞质溶胶中去。

大多数蛋白质似乎只在易位完成后才被定向运送去降解。是否这些蛋白质在细胞决定是否要降解它们之前都会待在易位子附近还不得而知。也不知道错误折叠的蛋白质是如何与逆行易位通道连到一起的。事实上，这种连接的景象似乎提示，ER 外的底物所采取的途径和要移除错误折叠的蛋白质所需要的胞质溶胶蛋白，都高度依赖于将要被降解的蛋白质的类型，以及错误折叠区域在蛋白质中的位置。好像可溶性蛋白和跨膜蛋白被降解的途径至少部分地彼此有所不同，在跨膜蛋白中，所用的降解途径也取决于异常部分是位于 ER 腔区域还是细胞液区域中。

一旦蛋白质进入逆行易位子中，该蛋白质好像是被来自胞质溶胶的力量移动而穿过该通道的。在许多底物（虽然不是所有的底物）的输出中泛素化起了作用。大多数降解底物被多聚泛素化，在这些底物还与膜有联系时泛素化就发生了。泛素化机构（machinery）的异常导致错误折叠蛋白在 ER 中聚集。这表明当底物不能够被修饰时通道就会被阻断。然而，单独的泛素化是不足以将蛋白质抽出到胞质溶胶中的。同时也需要与 ER 膜相联合的胞质溶胶 ATPase（p97；酵母中的 Cdc48），以及 p97 与那些直接结合到 ERAD 底物上的细胞液辅助因子相联合。目前还不清楚这种 ATPase 是怎样引起底物释放到细胞液中的，不过细菌和线粒体内类似的 ATPase 能够直接结合到膜内在蛋白

上，并且将这些蛋白质从膜上抽取出来。可能逆行易位所需的 ATPase 也以类似的方式行动，直接结合到底物上或结合到其附着的泛素上，然后将蛋白质从通道拉到细胞液中。蛋白酶体在逆行易位过程中所起的作用还不清楚。

ERAD 机构的另一个关键组分是小膜蛋白 derlin。Derlin 对一些错误折叠的蛋白质的逆行易位是必不可少的，已经显示出通过与 VIMP 蛋白的联合，它能够与 ER 中错误折叠的蛋白质及 p97 相互作用。因此，derlin 至少是 ER 腔与胞质溶胶中的降解机构之间的分子"桥"，尽管一定还有其他组分存在。

在很少的情况下，如图 3.36 所示，甚至当蛋白质正在向 ER 易位时，它们也被确定将要降解。尤其是，大的底物可能使用这种降解形式来避免易位整个蛋白质的能量耗费，如果该蛋白质还在合成的早期就错误折叠的话。当蛋白质正在被输入时就标示出那些需要被逆行易位的蛋白质，能够排除重新将其定向的需要。这种类型的降解最具特征的例子就是载脂蛋白 B（apolipoprotein B），这是一个非常大的分泌性蛋白，在 ER 腔中与脂（类）和脂肪酸相连作为组装低密度脂蛋白的第一步（见 3.22 脂类必须由 ER 运到其他细胞器的膜上）。当载脂蛋白 B 易位时，如果 ER 腔中的酶没有成功地将脂类转运到载脂蛋白 B 上，这将引起该蛋白质在合成和易位完成之前就开始降解。

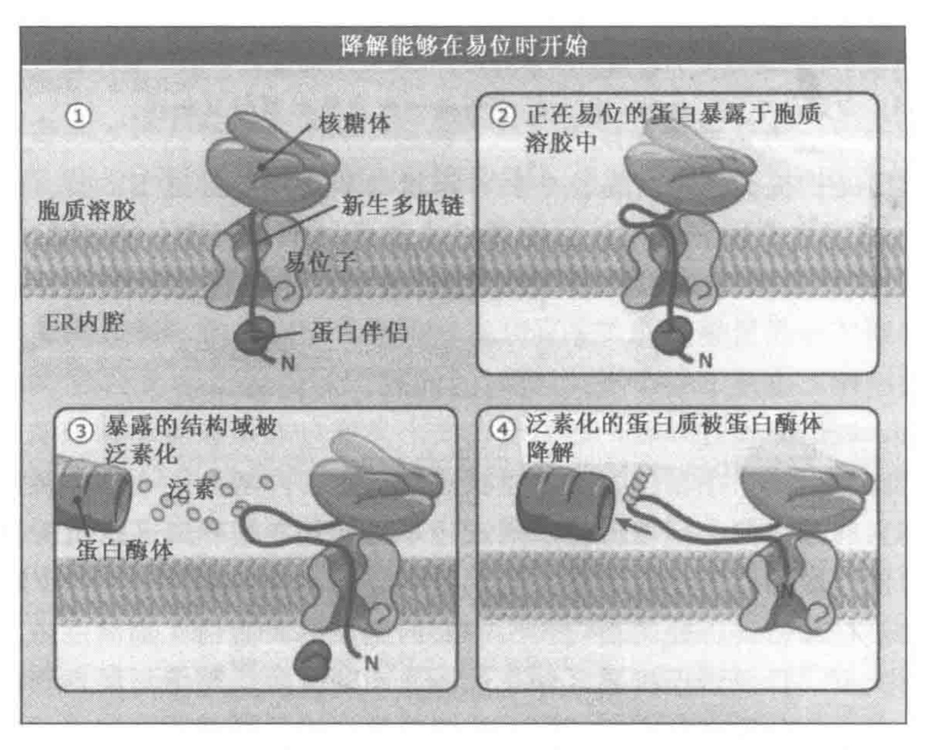


图 3.36　一些蛋白质在完全易位之前就会被降解。一旦蛋白质被指定降解后，该蛋白质的片段就会在细胞质中积聚并且被泛素化。

当蛋白质到达细胞液中时，它们通常被识别出来并被降解掉。然而在某些情况下，有迹象显示输出去的蛋白质反而特定地在细胞液中聚集。这些蛋白质积聚到被称作聚集体（aggresome）的物体中，聚集体可能用来分离和降解大量的蛋白质。

ERAD 的研究领域仍然处于初期。可能会有更多的作用因子，这一过程的分子机制仍然不甚了解。这其中包括如错误折叠的蛋白质如何被识别这样的基本问题。要对这一过程有更好的了解最终需要在体外实验中重现它。

3.20 ER与细胞核之间的通讯阻止未折叠的蛋白质在腔中积聚

关键概念

- 未折叠的蛋白质负责监视ER腔中的折叠状况，并且启动了增加ER蛋白伴侣基因表达的信号通路。
- Irelp蛋白通过对酵母细胞内应激情况的反应而活化，以此介导酵母体内的未折叠蛋白应答。
- 活化的Irelp剪切HAC1 mRNA，产生了Hac1蛋白，Hac1蛋白是一种定位于细胞核的转录因子，并通过UPE应答元件结合到基因启动子上。
- 在高等真核生物中，对未折叠蛋白的应答演化出了比酵母中所见的更多的控制层（layer）。

即使与ER相联系的降解充分地操作，在如温度升高、病毒感染或暴露于某些化学物质等细胞应激条件下，错误折叠的蛋白质仍然能够在ER中积聚。这预示着要经受质量控制机构处理，并且会干扰分泌。由于所有分泌途径上的蛋白质必须进入ER中，ER在整个途径中监视细胞内环境稳定方面起着非常重要的作用。ER能够感知源于ER内部或更远处蛋白质分泌的瓦解。**未折叠蛋白应答（unfolded protein response，UPR）**，是一个从ER腔到细胞核的信号通路（signaling pathway），有了它，细胞能监视ER中的折叠情况，并且增加ER蛋白伴侣的表达来应答增多的需求。这一通路存在于所有真核生物中，但那些基本的分子细节是在酵母中首次描述的。

对酵母的UPR来说，关键的中介物（mediator）——是一种在ER膜中，叫做Irelp的蛋白，它能感知ER腔中蛋白质的折叠情况，并且传递这一信息。Irelp能够通过它的腔内结构域的自联合（self-association）而发生二聚化，但在正常情况下，BiP与这一结构域相结合，抑制了Irelp二聚化。然而，在应激条件下，BiP转而与错误折叠

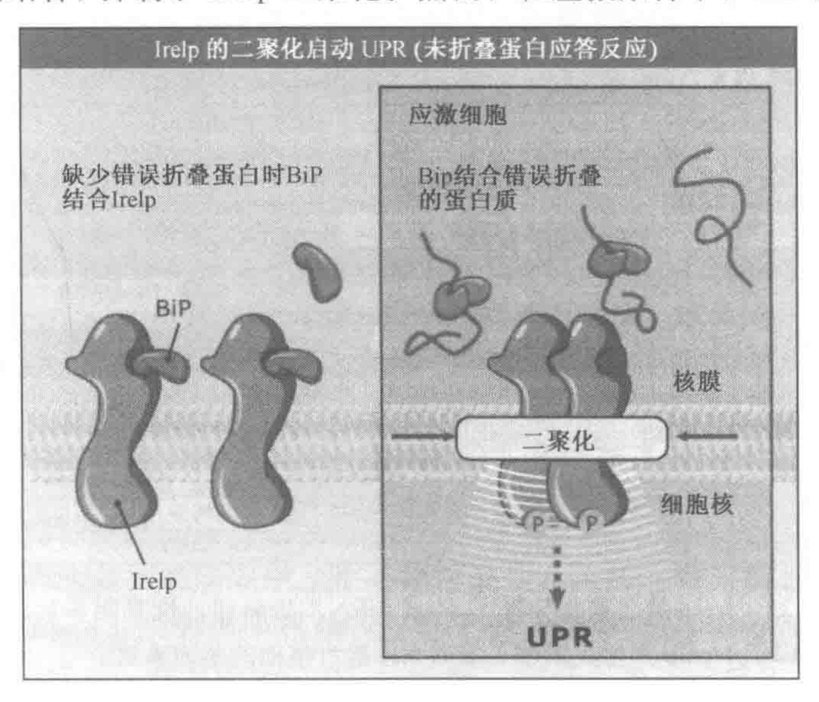


图3.37　在正常条件下，BiP能够结合到Irelp上并且防止其二聚化。在应激细胞中，BiP被未折叠的蛋白质占据。这就将Irelp解放出来进行二聚化，并且启始了未折叠蛋白应答反应。

的蛋白质相结合，遗下自由的Irelp去形成二聚体，并激发UPR信号通路，如图3.37所示。信号产生于Irelp的细胞液结构域，这是一个丝氨酸-苏氨酸激酶（可能Irelp定位于ER的亚区中，该亚区组成核被膜，Irelp的“细胞液结构域”实际上定位于核中，尽管这一论点还没有明确地提出）。

Irelp的二聚化诱导了自磷酸化和它的胞质区域激活。因此，Irelp的功能很像其他受体激酶，除了它是在配体（BiP）不在的情况下发生二聚化而不是有配体在场，以及信号是在细胞中各隔室之间传播，而不是从细胞表面到内部的传播（见MBIO：3-0004）。

如图3.38所示，一旦Irelp被激活，该蛋白细胞液区段中的第二个结构域就催化去除特定基因*HAC1*的mRNA中的内含子。当Irelp去除这个内含子后，tRNA连接酶将外显子连接起来形成新的mRNA。因此，Irelp的剪切与剪切体（spliceosome）催化的剪切无关（见MBIO：3-0005）。*HAC1* mRNA的剪切对UPR来说非常关键，因为内含子引起核糖体停顿在mRNA上，阻碍了Haclp蛋白的翻译。在内含子被去除后，Haclp就被翻译。

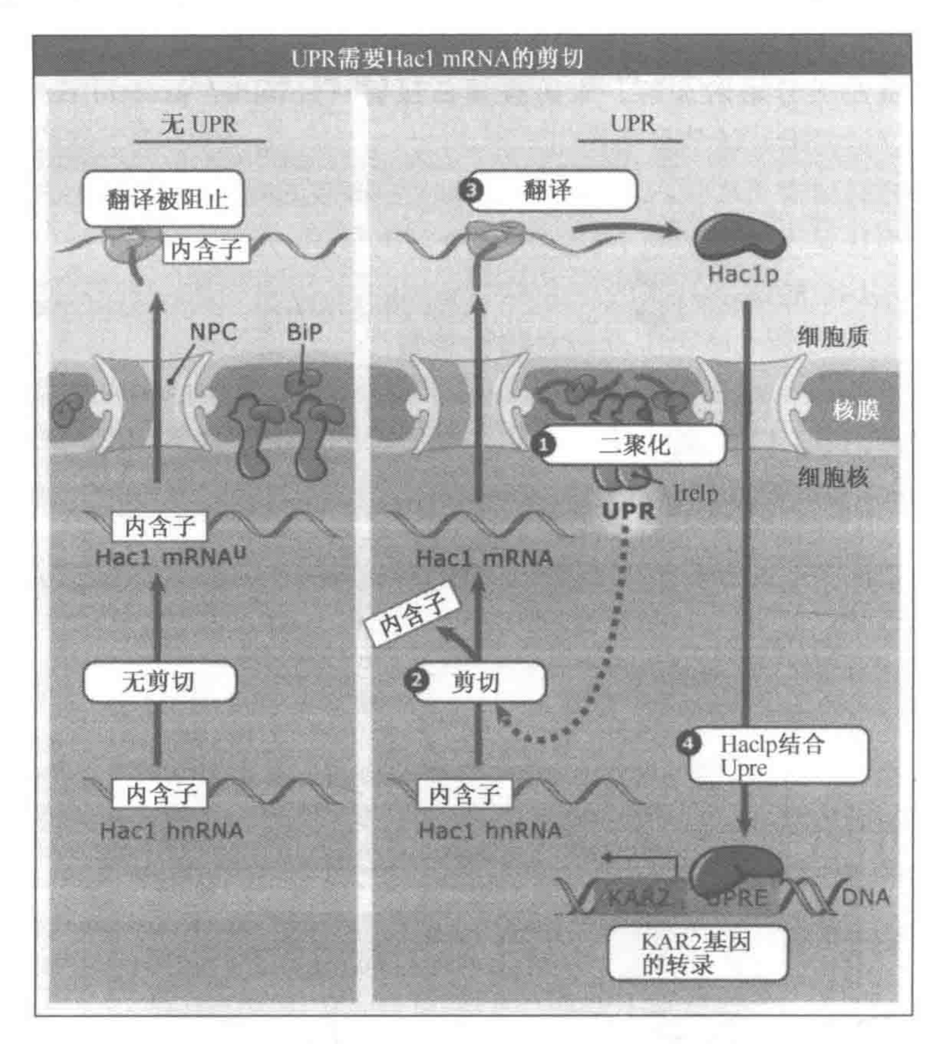


图3.38 Irelp的二聚化导致了Hacl mRNA的剪切，使其能够被翻译。转录因子Haclp产生，刺激了编码ER蛋白伴侣的基因表达。

Hacl蛋白是一个转录因子，它结合到编码BiP基因的启动子上并刺激它的转录（BiP在酵母中的同源物叫做KAR2）。转录因子的结合是通过一个称作未折叠蛋白应答元件（UPRE）的特定调节序列发生的。这一序列也出现在许多其他基因的启动子处，

Haclp 也刺激这些基因的转录。这样，通过与 BiP 联结感知错误折叠蛋白的存在，Irelp 启动了级联事件，最终导致产生额外的 ER 蛋白伴侣。这些蛋白伴侣提升了质量控制系统在应激情况下解决未折叠蛋白负担的能力。尽管 UPR 最初是因为它在特定的蛋白伴侣表达中的作用被发现的，数百个基因的表达也受到了影响。这些被诱导的基因的特性提示，翻译元件、易位元件、分泌元件和 ER 膜增长元件都因为细胞应答未折叠蛋白问题而受到改变。一个已经证实了的应答就是为 ER 的扩张而诱导脂合成（见 3.25 ER 是一个动态的细胞器）。

哺乳动物中的 UPR 与酵母中的 UPR 相似，但是更复杂。哺乳动物 Irelp 同源物也催化剪切作用来增强 ER 蛋白伴侣的表达，但那些信息被剪切掉的转录因子与 Haclp 无关。哺乳动物中的因子被称为 Xbp1。然而，哺乳动物 IRE1 看来只是哺乳动物 UPR 中的一个次要参与者，比如，缺乏 IRE1 的细胞仍然能够在应激情况下激活 UPR，并能够上调蛋白伴侣的表达。目前的假说是，哺乳动物中的 IRE1 控制着那些激发 ERAD 所需要的基因的表达。IRE1 和它的靶蛋白 XBP1 似乎在 B 细胞发育和分化中（该过程必须大量扩张 B 细胞的 ER 以利于抗体的合成和分泌）也有特定的关键功能（见 3.25 ER 是一个动态的细胞器）。

如图 3.39 所描绘的，哺乳动物的应答反应也涉及其他元件和通路，这些元件和通路在酵母细胞应答反应中不存在或者不重要。在哺乳动物中，ER 应激导致了叫做 ATF6 的另一个转录因子的活化。该蛋白质正常情况下横跨 ER 膜，但 UPR 的诱导却引起该蛋白质的跨膜结构域被切断。被解放出来的胞质结构域移向细胞核，在此它结合到 ER 蛋白伴侣基因的启动子上。除了提高质量控制系统的能力之外，在哺乳动物中 ER 应激也引起蛋白质合成的减少，以便更少的蛋白质被释放到 ER 中。这一作用由 PERK 蛋白介导，这是一个跨膜的 ER 激酶，具有一个与 Irelp 的同源的腔结构域，但它的胞质激酶结构域与 Irelp 无关。PERK 在胰腺中高表达，它的失活导致胰腺功能障碍，这表明 UPR 在分泌量大的器官中的重要性。PERK 蛋白活化了的胞质结构域将通用翻译起始因子 eIF2 的 α 亚基磷酸化。这一磷酸化导致了广泛的蛋白质合成抑制，从而减少了进入 ER 中的蛋白质负荷（见MBIO：3-0006）。重要的是，这种作用仅仅是瞬间的，以便能够接纳增加的蛋白伴侣合成。另外，至少是编码转录因子 ATF4 的 mRNA，只有当 eIF2α 被磷酸化并且普遍的蛋白质合成受到抑制时才被翻译。当 eIF2α 的磷酸化导致了 ATF4 的合成时，ATF4 转移到细胞核中，调节基因的表达，这些基因涉及细胞动能、氧化还原平衡及氨基酸合成。值得注意的是，在不同的细胞应激状况下（如病毒感染导致 eIF2α 激酶 PKR 的活化），其他激酶将 eIF2α 磷酸化，于是 ATF4 的靶物质就是那些在应答普通压力中非常重要的基因，而 ATF6 和 IRE1 通路可以被认为是更属于 ER 应激特异性的。

UPR 的活化在大范围的病理中发生，如神经变性疾病、糖尿病、肝功能障碍、凝血失常（clotting disorder）以及其他情况。在实验系统中，UPR 持续的活化导致细胞死亡途径的活化。然而，许多涉及 UPR 的疾病的病程有数月或数年，这表明 UPR 在病理状况下活化时，必然还有凋亡之外的其他适合的应答。UPR 活化了促存活以及促凋亡途径，目前还不清楚细胞是如何在长期的压力下得以存活的。

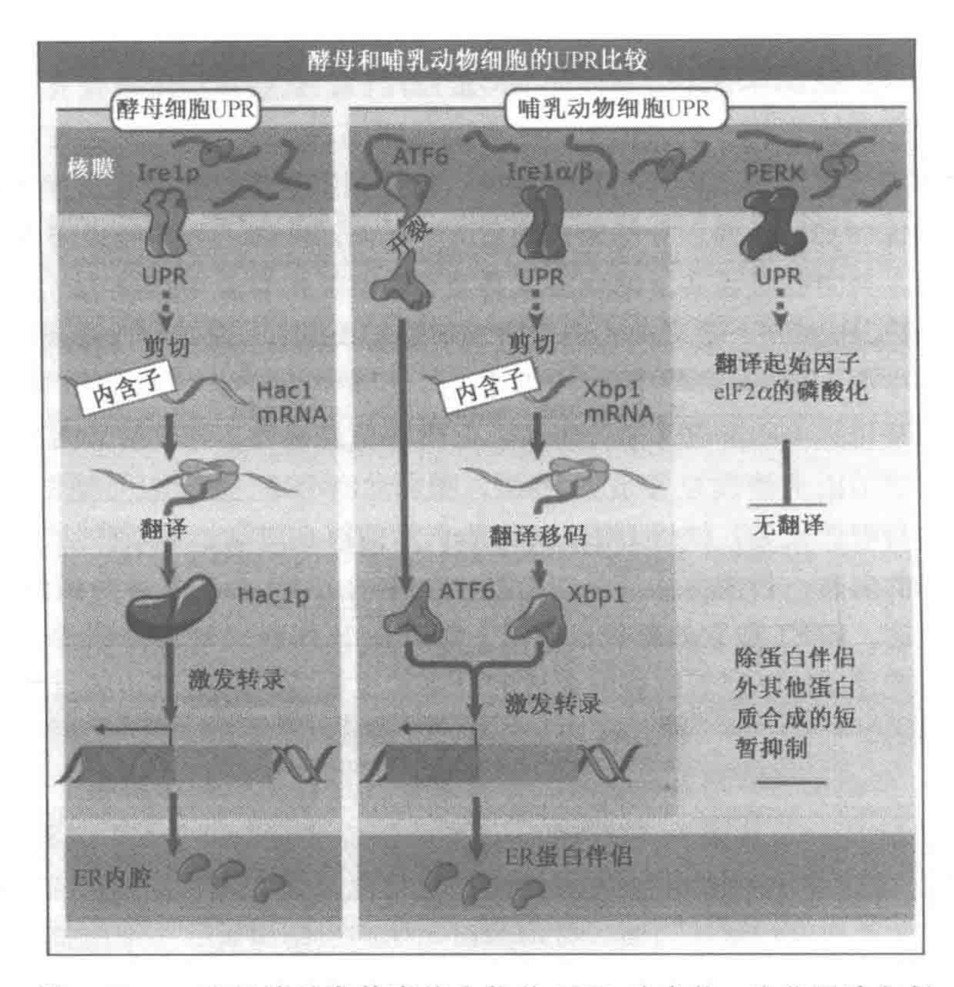


图 3.39　一些通路是高等真核生物的 UPR 独有的，这些通路包括 PERK 参与的翻译抑制和 AIF6 的剪切形成转录因子。

3.21　ER 合成大部分细胞磷脂

关键概念

- 多数细胞磷脂主要在 ER 膜的胞质面合成。
- 参与脂（类）生物合成的酶的定位被细胞控制，从而调节新脂的生成。
- 胆固醇的生物合成受到一个整合到 ER 膜中的转录因子的蛋白水解作用的调节。

除了将蛋白质易位和为分泌途径准备蛋白质之外，ER 也是细胞磷脂的主要合成地点。这些分子在 ER 膜上合成，此后分布到细胞中的许多分隔的膜和膜性细胞器中。其中包括质膜、线粒体和分泌途径中的细胞器。

细胞必须有能力扩张其膜来应对特殊需要。最明显的就是质膜和所有必须在细胞周期中出现的膜性细胞器的倍增。另外，当特殊的细胞器承受了很大的负担时，这些细胞器就会扩增。例如，当 B 淋巴细胞前体分化为抗体分泌细胞时，ER 就通过大量的扩增来适应分泌途径中运输的增加（见 3.25 ER 是一个动态的细胞器）。

由前体物从头合成磷脂最初发生在 ER 膜的细胞液面，一种叫 **Kennedy 途径**的过程中。如图 3.40 所示，当两个脂肪酸分子连接成乙酰辅酶 A（acetyl CoA），3-磷酸甘油添加进来，形成**二酰基甘油（diacylglycerol，DAG）**，ER 膜随之扩增。与它的前体物相

比，DAG 足够疏水，能插进 ER 膜。

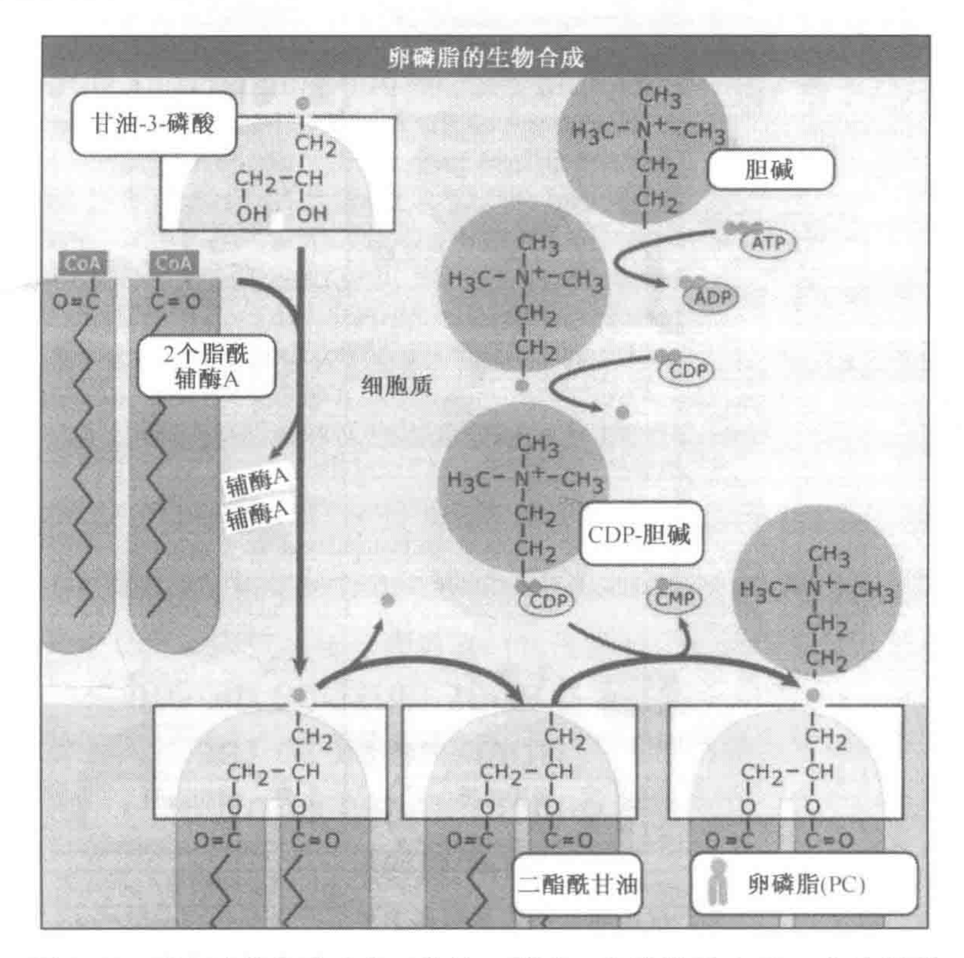


图 3.40　当水溶性胞质成分（甘油-3-磷酸、脂酰辅酶 A 和一个头部基团）被结合时，磷脂分子便形成了。新的脂溶性分子被添加到膜上。

DAG 一旦在膜里面，它会加入一个头部基团而形成一个完整的磷脂。很多磷脂之间主要的不同在于头部基团的性质，如图 3.41 所示。所有磷脂的合成都是通过将头部基团添加到 DAG 上。头部基团首先被磷酸化，然后附着到胞苷二磷酸（cytidine diphosphate，CDP）上。头部基团与磷酸盐之一一起转移到 DAG 上，完成了合成过程。

胆碱头部基团添加到 CDP 上形成磷酸卵磷酯（phosphatidylcholine），这一过程阐明了细胞是如何利用蛋白质的亚细胞定位来调节生物合成过程的。这一反应由胞苷酰转移酶（cytidylyl transferase，CT）催化完成，并且是磷酸卵磷酯生物合成的限速步骤。细胞通过在两个分开的库中储备 CT 来控制磷酸卵磷酯的合成：一个失活的酶细胞液储备库和一个在 ER 膜的细胞液面的有活性的酶储备库。

维持这些储备库的机制还没有完全清楚。然而，目前已经知道细胞中传达需要增加磷酸卵磷酯合成这个信息的条件，能够控制 CT 在这两个库之间的移动。例如，细胞内自由 DAG 或脂肪酸浓度的升高引起 CT 移向 ER 膜。以便这些组分能够添加到胆碱头部基团。与此相反，当细胞中磷酸卵磷酯的量很多时，CT 位于细胞液中。以这种方式，磷酸卵磷酯的产生就停止了。

除了磷酸卵磷酯这一含量最高的膜磷脂外，磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine）和磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol）也能够经 Kennedy 途径产生，正如磷脂

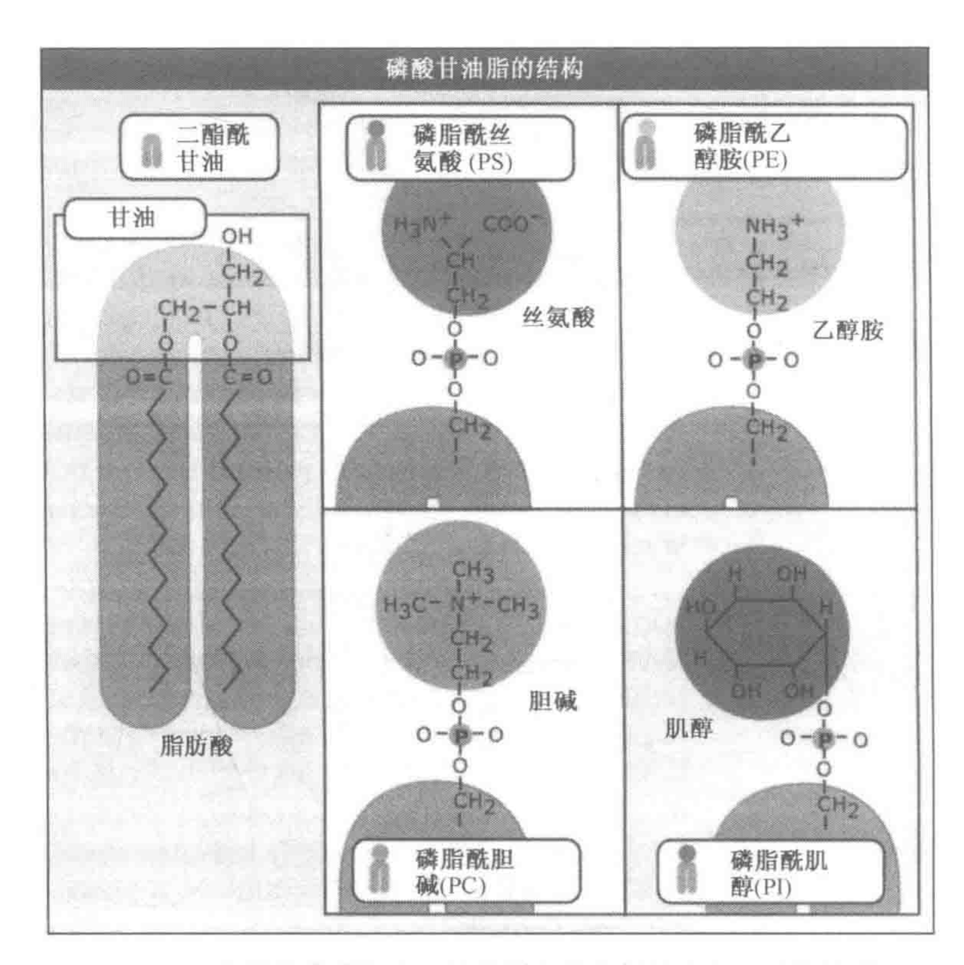


图 3.41　主要的膜磷脂之间的差别在于它们的头部基团的组成。

酰丝氨酸（phosphatidylserine）能够在酵母 *S. cerevisiae* 中产生一样。然而，在动物中，磷脂酰丝氨酸由另一种不同的反应产生，这一反应不包括 CDP 但是也发生在 ER 膜的细胞液面上。

磷脂酰乙醇胺合成的一个有趣的方面是，尽管这种磷脂能够在 Kennedy 途径中合成，它也能够在线粒体中产生。在线粒体中它是对 ER 中合成的磷脂酰丝氨酸进行修饰而得来的。磷脂酰乙醇胺的产生位置与其前体所在的位置不同，这就需要一种机制来进行这两个位置之间的脂（类）运输。各种迹象显示脂（类）的运输发生在 ER 中一个特定的亚区，该区域被称为**线粒体相关膜（mitochondrial-associated membrane，MAM）**。MAM 是 ER 中与线粒体有实在联系的一个区间，该区域表面很平坦，并且与线粒体膜有紧密的接触。磷脂酰丝氨酸合成的酶集中在 MAM 中。尽管这一机制还没有弄明白，但似乎这一接触区域使得磷脂酰丝氨酸能够被快速转移到线粒体。

除了在磷脂的合成中起作用外，ER 也是类固醇（sterol）合成的地点。胆固醇（cholesterol）是细胞膜中主要的类固醇类物质，其生物合成是经多步反应完成的。前几步反应在细胞液中发生，剩余的步骤在 ER 膜中完成。ER 中也驻有一些调节刺激和抑制胆固醇合成所需的元素。这一调节途径的关键调节因子是类固醇调节元件结合蛋白（SREBP）家族。这些蛋白质有顺序地整合在 ER 膜中，两个跨膜结构域之间有一段小的腔部环相连，N 端和 C 端都伸向细胞液中。位于 ER 中的还有一种蛋白质叫作 SCAP（for SREBP cleavage- activating protein，SREBP 切除活化蛋白）。SCAP 对细胞内胆固醇的水平作出应答。当需要合成更多的胆固醇时，SCAP 被认为护送 SREBP 从 ER 到

高尔基体。在此，蛋白酶切开 SREBP，将蛋白质的 N 端解放到细胞液［这些酶是与在 ER 应激反应中切 ATF6 的同样的蛋白酶（见 3.20 ER 与细胞核之间的通讯阻止未折叠的蛋白质在腔中积聚）］。然后 SREBP 的 N 端结构域进入核中，在此它作为一种转录因子，活化胆固醇生物合成途径中相关基因的表达。

3.22 脂类必须由 ER 运到其他细胞器的膜上

关键概念

- 每一种细胞器都有其独特的脂类组成，要求脂从 ER 转运到每一种细胞器的过程都是特异性的。
- 脂类在细胞器之间转运的机制还不清楚，但是可能涉及 ER 与细胞中其他的膜之间的直接接触。
- 脂类的跨双层膜运动建立起膜页的不对称性。

脂类在 ER 合成之后必须被转运到细胞的其他膜上。由于膜性细胞器的膜在脂类组成上并不相同，使得这一过程变得复杂；所以转移是一个特异的过程，而不是膜之间脂类的非特异性交换。因此，一定有某种机制不仅是绕着细胞移动脂类，而且指导这种转移使其具有特异性。

虽然脂类转移的机制还不清楚，人们已经提出了一些运动方式。其中一种可能的机制就是通过膜之间的直接接触，如在 MAM 处 ER 与线粒体之间发生的直接接触。据推测，两个细胞器的膜紧密并列能使磷脂更容易在它们之间移动。这种脂类分布的机制是有道理的，因为已知 ER 是与细胞的所有主要细胞器进行直接接触的。其中包括质膜、高尔基体反面网状结构、过氧化物酶体、液泡和内体/溶酶体。虽然对这些接触的功能意义还没有像对 MAM 的认识那样清楚，如果它们确实是类似的，它们能提供一种方法，既为脂类从一种细胞器移动到另一种细胞器所用，还能够保证脂类转移过程中的特异性。

也有其他的假说提出来说明脂类转移的原因。直到最近，最普遍的看法涉及磷脂转移蛋白（phospholipid transfer protein）。这些蛋白是在体外实验中以它们在膜之间交换脂的能力为基础鉴定出来的。这些蛋白质将一种脂从膜脂双层中提出来，在疏水结合口袋（hydrophobic binding pocket）中与其一起扩散直到到达另一处膜上。虽然这些蛋白质可能参与了磷脂在细胞器之间的直接转移，但这还不能够解释细胞器的脂量扩大现象，因为当脂从一个蛋白质上分离下来进入一处膜时，这个膜上的另一个脂就会与该空载蛋白结合在一起。目前还缺少这些蛋白质在体内脂运输中起作用的证据。

也有其他假说提出，新的脂类是与蛋白质一起形成小泡通过分泌途径移动来进行分布的。然而这一假说看起来不大可能，因为阻止小泡通过该途径移动的药物并不能阻断脂类从 ER 到质膜的移动。分泌小泡也不能将脂类运送到线粒体和叶绿体，因为 ER 甚至没有通过分泌途径与这些细胞器彼此连接。

在一些情况下，ER 合成的脂类被送到其他细胞中。为了达到这一目标，某些特化的细胞类型将特定的脂以**脂蛋白（lipoprotein）**的形式通过分泌途径运送。脂蛋白是大的蛋白质和脂类的聚集体，用于转运水溶性物质，尤其是通过血流运送胆固醇（cho-

lesterol）和三酰基甘油（triacylglycerol）。该复合体包含一个胆固醇和三酰基甘油的核心，被单层磷脂和蛋白质包围着。根据它们的密度，分为多种类型的脂蛋白，其中最令人感兴趣的就是低密度脂蛋白（LDL），因为它们在肝细胞和肠细胞的 ER 腔中合成，然后经由分泌途径运出细胞。极低密度脂蛋白（VLDL）的磷脂，即低密度脂蛋白的前体，在 ER 的胞质面合成，据信此后要跨 ER 膜翻转。当它们易位进入 ER 腔后与 ApoB 蛋白相互作用。一旦组装好，VLDL 颗粒就通过分泌途径移动进行分泌。如果 VLDL 颗粒没有在 ER 腔中成功组装，ApoB 就会经由逆行易位返回到细胞液中进行降解（见 3.19 ER 中错误折叠的蛋白质最终被送回到胞质溶胶中降解）。

3.23 膜的脂双层中，内层与外层脂类组成不同

关键概念

- 脂分子在脂双层两个页面之间的移动是建立膜的不对称性所需要的。
- 脂在两个页面之间的移动需要“翻转酶”（flippase）。

脂类在膜的两面（leaflet，页）中的分布常常是不对称的。例如，磷酸卵磷酯在质膜的胞外一面含量丰富，但磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸主要分布在细胞液这一面。某些细胞信号通路和细胞与细胞之间的相互作用都依赖于这种不对称性。由于脂类的极性头部基团无法穿越脂双层的疏水内部，使得这种不对称状态得以维持。结果是，脂在膜的两个页面之间的自发移动非常缓慢。

脂类无法自发“翻转”（flip），需要翻转酶催化这种移动。在 ER 膜中必须至少有一些这种酶存在，因为脂类合成只在膜的胞质一面。如果没有酶催化翻转，只有合成新脂的那一面才能够扩张。酵母中的 Rftlp 蛋白已被证实是一种磷脂翻转酶，但其作用机制还不清楚。Rftlp 和其他翻转酶可能只是简单地平衡两个页面之间的脂类，或者脂类翻转可能受到调节来使脂做特定的移动，从而产生页面的不对称性。维持这种不对称性似乎需要对磷脂头部基团具有选择性的酶，以及耗费能量。虽然有足够的生物化学证据表明有翻转酶存在，对这些蛋白质的纯化和性质鉴定仍然困难。目前还不清楚它们在细胞中的分布如何，以及它们定位在哪里。

3.24 ER 按其形态和功能可以再进行细分

关键概念

- 从形态学上 ER 被细分为特化的隔室，其中包括用于分泌蛋白质的粗面 ER、用于类固醇合成和药物解毒的光面 ER，以及用于钙储存及释放的肌质网。
- 根据特殊类型细胞的需要，光面 ER 的功能能被特化。
- 在分子水平用非形态学方法，ER 也能够被进一步细分。

电子显微镜对 ER 的观察显示该细胞器具有显著的异质性。在细胞的一些区域，ER 形成了大的扁平面（cisternae，扁平膜囊），它们通常平行排列，在一些情况下还非常紧密地堆叠在一起，如图 3.1 所示。在其他区域，ER 呈长的弯曲管状。细胞器的这

两种形式相互连接并形成单个的连续结构。这些片层和堆叠状物一般在核膜附近发现，它们本身是 ER 的一部分。管状物形成网络遍布细胞，与质膜及其他细胞器的膜相接触。

ER 结构的多样性反映了其诸多功能从空间上分隔开来，分配到了不同的特化亚区。这一特化可以看作是 ER 形成过程的延续，该过程即质膜首先特化为进行分泌的那一部分最终形成了 ER。一旦形成，ER 需要有新的功能，其自身的膜会进一步分成特化的区域。目前已经清楚 ER 以功能为基础高度细分，但维持这种分隔的机制还不清楚。

ER 网络被分成**光面 ER（smooth endoplasmic reticulum）**和**糙面 ER（rough endoplasmic reticulum）**。糙面 ER 表面均匀地覆盖着核糖体，这些核糖体正在翻译将被分泌的蛋白质或者将插入到 ER 膜中的蛋白质。用电子显微镜能清楚地看到这些核糖体，电镜下 ER 膜表面布满颗粒或者显得粗糙。糙面 ER 在分泌大量蛋白质的细胞中含量非常丰富。这些细胞包括内分泌细胞，如胰腺的 β 细胞，这种细胞分泌激素到血流中，以及 B 淋巴细胞，该细胞产生和分泌抗体。如图 3.42 所述，在这些种类的细胞中，糙面 ER 能扩展而占据细胞内部的大量空间，而其他种类的细胞中糙面 ER 分布较少。

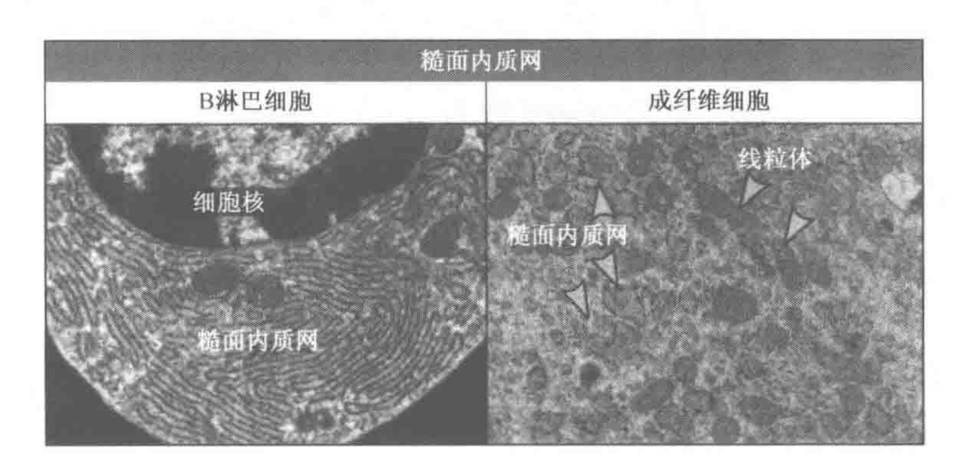


图 3.42 透射电子显微镜照片显示的糙面 ER 形态。在一些细胞如合成大量免疫球蛋白的 B 淋巴细胞中，糙面 ER 占据了细胞质的大量空间，并且以平坦的堆叠起来的片状物形式存在。相比之下，胚胎成纤维细胞中的糙面 ER，它分泌胶原和其他胞外基质蛋白，更多地呈现为管状物。左图：Don W. Fawcett 博士惠赠。右图：Tom Rutkowski 惠赠。

与此相反，如图 3.43 中显示的，光面 ER 缺少核糖体。在大多数细胞中，光面 ER 主要位于含有蛋白质的小泡从 ER 出芽转运到高尔基体的地带。这一区域被称为**过渡型 ER（transitional ER）**，或者 ER-高尔基体中间隔室（ER-Golgi intermediate compartment，ERGIC）。

光面 ER 被广义地定义为任何没有核糖体的 ER，它也负责一些其他功能，包括脂类代谢、类固醇合成、糖原代谢以及药物解毒。这些功能比糙面 ER 的功能更加特化，并且光面 ER 比糙面 ER 少得多。虽然在大量使用这些功能的一种或另一种的细胞中，光面 ER 能够扩展变得与糙面 ER 一样普遍。例如，睾丸 Leydig 细胞在合成睾酮时利用了大量的光面 ER。与此类似，肝细胞中大面积的光面 ER 网络藏有细胞色素 P450 和其

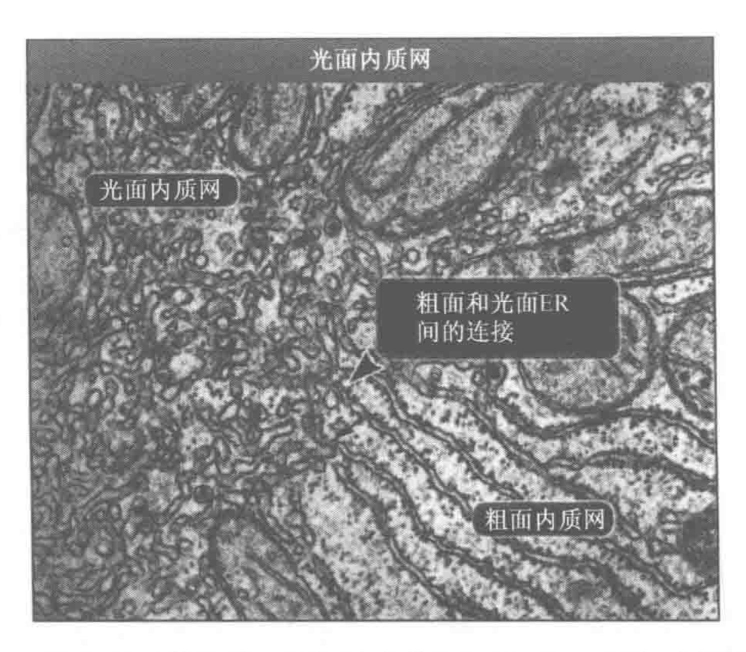


图 3.43 肝细胞的电镜照片。肝细胞在伸展的光面 ER 网络中解毒药物，光面 ER 在图的左半部分可看到。光面 ER 具有卷曲管状，从横切面上看就像是圆环或椭圆环。在图中指出了光面 ER 与糙面 ER 之间的连接处。请注意，这两种类型的 ER 多么清楚地分成了不同的区域。照片由 Don W. Fawcett 惠赠。复制自 *The Cell*，1981。原始照片发表在 *The Journal of Cell Biology*，1973，vol. 56，pp. 746-761，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。显微照片由 Berne 大学的 Ewald R. Weibel 惠赠。

他种类的酶来将化学药品解毒并且排掉。在这些细胞中，光面 ER 的量随着对暴露于一定的药物作出反应而波动，当使用了药物时 ER 量就增加，当药物被去除时 ER 的量就会减少。尽管光面 ER 与糙面 ER 的形态差异非常明显，关于 ER 的这些分区怎样维持，对此还是没有明确的意见，而它们的功能可能有所重叠。

在骨骼肌细胞中，光面 ER 进一步分化成亚区，称作**肌质网（sarcoplasmic reticulum，SR）**。这一亚区与 ER 的其他部分相比很庞大，并且形成了广阔的网络，将肌肉的肌小节包围起来，如图 3.44 所示。肌集钙蛋白（calsequestrin）是一种具有多个低亲和性钙结合位点的蛋白质，其作用是在肌质网中储存细胞内的钙。当 SR 膜上的钙通道打开时，将钙释放到细胞液中激发肌肉的收缩。此后钙被 SR 上不同部位的钙特异性泵迅速吸收回去。因此，SR 可被看作是一类特化来吸收、储存和释放钙的光面 ER。尽管 SR 已经在骨骼肌中得到了很好的研究，它在其他类型的也需要快速钙调节的细胞中还少有对应物。

尽管 SR 已经演化为专门的快速释放钙的细胞器，在大多数类型的细胞中钙的吸收和储存也是 ER 的主要功能。这一功能用于细胞信号通路中使细胞内钙浓度快速变化，故显得尤为重要（见第 14 章细胞信号转导原理）。在非肌细胞中，钙被钙网织蛋白（calreticulin）结合在 ER 中，钙网织蛋白具有双重作用，既是钙结合蛋白又是糖蛋白的伴侣分子（见 3.17 钙联结蛋白/钙网织蛋白陪伴系统识别糖类修饰）。其他 ER 腔中含量比较丰富的蛋白质，包括 BiP、Grp94、ERp72、PD1 和钙联结蛋白，在体外实验中都能够结合钙，也可能对 ER 储存钙的能力起了作用。像 SR 中的肌集钙蛋白一样，



图 3.44 在这张骨骼肌细胞的电镜照片中肌质网很明显。肌质网是光面 ER 特化出来的一种变体，用来储存钙并在肌肉收缩时将钙释放。在照片中，有三条肌原纤维从上到下伸展。肌质网以大面积的网状结构在中部将肌原纤维包围起来。照片由 Don W. Fawcett 惠赠。复制自 *The Cell*，1981。原始照片发表在 The *Journal of Cell Biology*，1965，vol. 25，pp. 209-231，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。显微照片由 Pennsylvania 大学的 Lee D. Peachey 惠赠。

这些蛋白质在多个位点以低亲和性结合钙。由于 ER 在钙储存中的作用，ER 腔中的蛋白伴侣普遍都需要钙来使其发挥最佳的功能。例如，BiP、钙联结蛋白和钙网织蛋白在 ER 的钙储存去除后都不能充分地行使其功能，以至于长期的钙缺失能够诱发未折叠蛋白应答。

ER 的钙释放不仅对启动信号级联反应是重要的，并且对某些环境下凋亡的触发也是重要的。与线粒体紧密联系的 ER 区域（见 3.21 ER 合成大部分细胞磷脂）似乎使线粒体能够快速吸收 ER 释放出的钙，据认为这会助力线粒体中的变化导致细胞死亡。

尽管如光面 ER 和糙面 ER 这样的 ER 亚区在形态上很明显，ER 还有其他一些不容易被看到的不均一性。例如，虽然 ER 与核膜具有连续性，一些蛋白质还是被限制在内层核膜上，在外层核膜和 ER 的其他部位都没有发现。蛋白质的定位通常建立在它们与核纤层或染色质的物理联系上。ER 的其他功能性亚区可能会存在于 ER 与其他细胞器接触的地方。磷脂酰丝氨酸合酶的活性集中于 ER 膜与线粒体相互联系的部位。还有一些蛋白质定位于 ER 与过氧化物酶体密切接触的位置。可以推测，其他亚区也可能有

一批独特的 ER 蛋白。ER 上磷脂、胆固醇的分布，甚至核糖体连接的编码易位蛋白的 mRNA 的分布，也是不均一的。这些组分不均一性的任何功能意义都还没有研究清楚。虽然如今许多在 ER 的功能中起作用的分子成分已经确定，这些成分空间限定的机制已能够解释。

3.25 ER 是一个动态的细胞器

关键概念

- ER 的大小和组成随着对细胞需求的应答而变化。
- ER 沿着细胞骨架移动。
- ER 扩展和收缩以及形成管状的机制已被揭示。
- 控制 ER 组成的信号通路还未完全了解，但此通路可能与未折叠蛋白应答有重叠。

像许多细胞器一样，ER 必须适应细胞不断变化的需求。ER 的部分区域必须在需要时进行一定的扩张和收缩，细胞必须能够移动并重新组织这些细胞器，以及维持其形态。在有丝分裂期间，ER 必须被分配到子细胞中。尽管在分子水平上这些过程如何进行还不是很清楚，但目前已经了解到这一细胞器是动态的。

ER 的形状不断变化。尤其 ER 的管状成分更是处于不断的流动、延长、分开和融合之中。这些变化或多或少与细胞骨架相关，在哺乳动物细胞中，ER 的管状成分常常与微管处于同一条直线上，并明显沿着微管扩展和收缩。然而，将细胞骨架破坏之后并没有导致 ER 瓦解或者使其管状延伸网络崩解。在体外实验中，细胞骨架在管状成分和网络的形成上并不是必需的。因此，管状成分形成及组装成网络是 ER 自身具备的特点，并不依赖于细胞骨架。细胞骨架的作用可能是保证 ER 网络形成之后能够分散在细胞各处。

细胞形成 ER 或将其扩展的机制还不清楚，但已鉴定出一些主要特征。在体外实验中，ER 管的形成需要 ATP 和 GTP，可能还需要一种与参与 ER-高尔基小泡融合的蛋白相似的蛋白质。这些需求都表明 ER 的增生过程会发生一些融合事件，将 ER 小泡转变成为大的相互连接的网络。一些形式的调节对融合后产生管状部分是必要的，而不涉及无定形物质。在所有真核生物中 ER 的管状外形都能观察到，这表明特定形状的形成受到控制，并且这种控制非常重要。管状外形可能会导致脂类的选择性分布，从而在扩展的 ER 网络中精确定位。一些脂类的头部基团比尾部大，因此在脂双层中它们头部基团的存在能够导致脂双层弯曲。这些脂类的特异性定位能够导致膜局部弯曲，这有利于管状物的形成。还有一种可能性就是在其表面有蛋白框架存在导致膜弯曲，从而使 ER 管状结构得以形成和维持。ER 的形状在一定程度上受所含蛋白质的引导，图 3.45 描绘了 ER 上驻留的跨膜蛋白质之间较弱的相互作用能够明显地改变 ER 的形状和分布。目前还不清楚一些粗面 ER 的扁平形状特征是如何形成的，以及为什么这些扁平层经常相互堆积。

细胞对 ER 网络的需求扩大时，细胞调节 ER 的大小和形状的需要由细胞器的行为体现出来。例如，与其他类型细胞相比，对分泌途径有很高需求的细胞，如内分泌细胞、粗面 ER 会大量扩展。这是通过一种反馈机制来实现的，在应答分泌时 ER 的蛋白

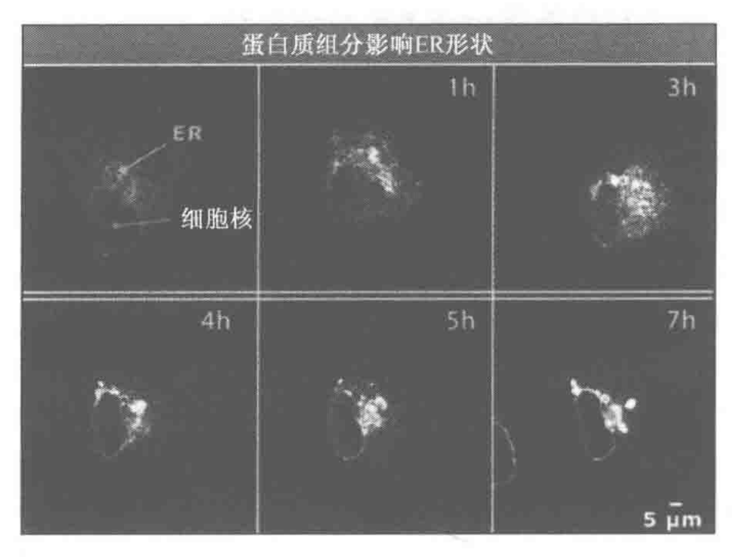


图 3.45 荧光跨膜蛋白的过度表达导致 ER 的结构在几小时内发生变化。复制自 *The Journal of Cell Biology*，2003，vol. 163，pp. 257-269，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

质运输增加这一情况时，该反馈机制通知对脂类和 ER 蛋白合成的需求，使 ER 的扩展得以实现。能够被光面 ER 解毒的药物，如苯巴比妥也能够导致 ER 扩张，并且这些药物的去除将使光面 ER 很快地返回到正常大小。ER 改变其大小能力的另一种令人困惑的现象就是某些膜蛋白过度表达形成 **karmellae**。图 3.46 描绘了细胞中 karmellae 形成的例子。这些结构由 ER 堆积而成，它们与核被膜紧密相连，内含过表达蛋白质。它们似乎作为一个膜库将过剩的蛋白质储存其中。此外，由 ER 到基因表达及脂类合成的反馈通路看来是相似的。

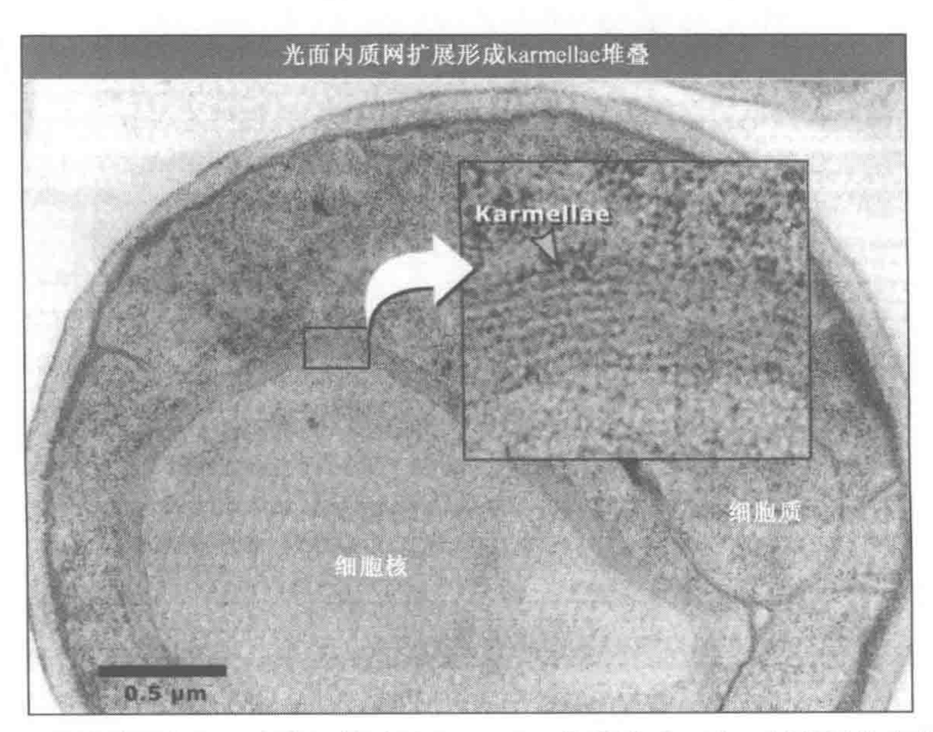


图 3.46 一些跨膜蛋白的过度表达导致了 karmellae 堆积形成。这一幅酵母的电镜照片显示了围绕着细胞核的 karmellae。复制自 *The Journal of Cell Biology*，1988，vol. 107，pp. 101-114，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

有趣的是，未折叠蛋白应答这一在 ER 和细胞核之间已经确认的信号通路可能在 ER 的增生中起着一定的作用。在细胞中 UPR 的激活不仅刺激了蛋白伴侣的合成而且增加了肌醇的合成。肌醇是膜中四类主要的脂类之一磷脂酰肌醇的头部基团。在蛋白伴侣合成上调过程中，Irelp 和 Haclp 调节了酵母中的这一应答过程。其他磷脂的合成可能也受到了激发，使得细胞中 ER 的总量增加。因此，UPR 可能用于感知 ER 中一系列的变化，以及引发细胞器重新改变其外形。尽管这一观点很吸引人，但到目前为止还没有得到证实。

细胞能感知对 ER 增生的需求，而不至于因 ER 应急而导致细胞死亡的机制是什么？在 B 细胞分化成为分泌抗体的浆细胞时，UPR 的活化及 ER 膜的扩展似乎促进了分化过程中免疫球蛋白的大量增加。这一发现表明可能会有某种机制使 UPR 能够预计到 ER 负担而被活化，而不是严格地对其做出应答。同样，在植物中 ER 衍生出来的隔室被广泛用来储存种子发育和抵抗病原体过程中较重要的各种蛋白质和油脂。人们认为这些储存的蛋白质会聚集在 ER 衍生出来的隔室中，这是一种蛋白质贮留的方式，而不是降解它们。对 ER 蛋白伴侣的上调似乎也促进了蛋白质在这些隔室中聚集。

要维持 ER 所面临的另一个问题就是在细胞有丝分裂过程中 ER 的分割（见第 11

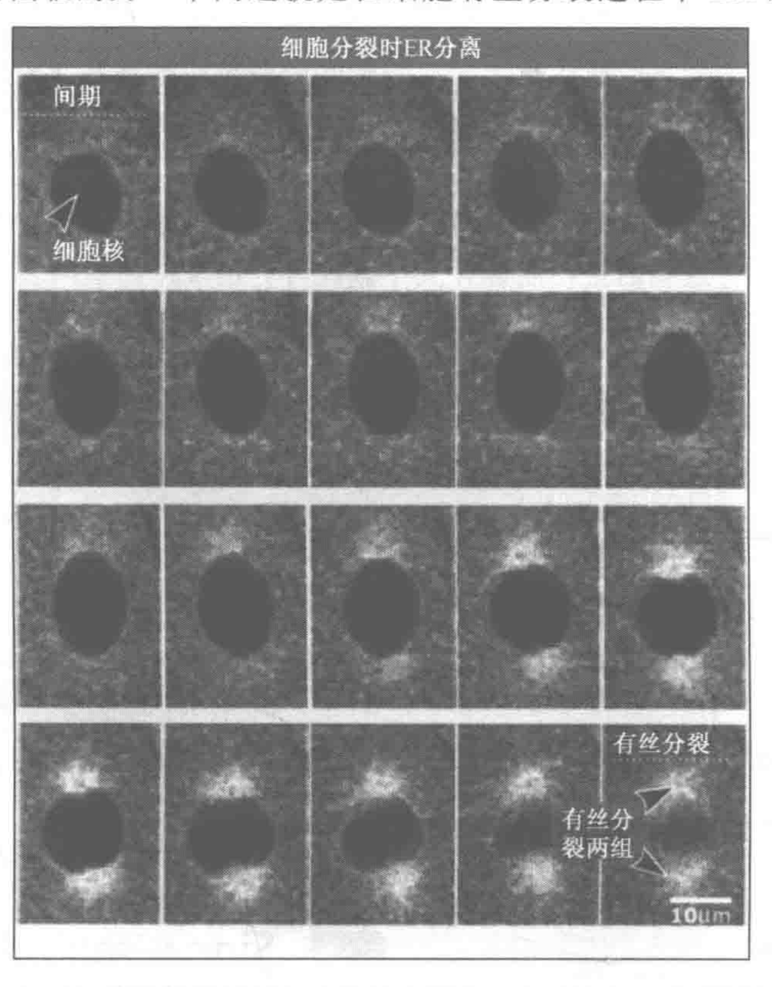


图 3.47　进入有丝分裂的海胆卵裂细胞的荧光照片。在左上方是分裂间期，右下方为中期。在细胞分裂过程中 ER 仍然保持着连续的网络结构，并且聚集在分裂两极。只存在于 ER 中的一种荧光蛋白的表达使得 ER 能够被观察到。照片由 Terasaki，*M. Mol. Biol. Cell.* March，2000. 11 (3)：897-914。Copyright© 2000 by The American Society of Cell Biology 惠赠。

章细胞周期调控）。ER不能重新合成，只能从已有的ER中来，这使得ER正确的分配变得很必要。将ER平均分配到两个子细胞中对细胞也是有利的。如果一个细胞接受到的ER明显少于原来的一半，下一个细胞周期将会延迟，这在许多情况下都是很有害的。ER为细胞有丝分裂所做的最明显的准备发生在核膜处。当有丝分裂开始后，核膜破碎，核孔复合体解聚。这一过程提示有信号在有丝分裂之前促使核膜崩解，之后使核膜重组装。ER的其余部分在有丝分裂期间必须分开。在一些种类的细胞中，这一分离现象伴随着囊泡化（即崩解），以及有丝分裂之后ER重新形成。然而，在大多数细胞中ER在整个有丝分裂期间仍是作为一个连续的网络存在，在胞质分裂时也只是分成两个大致相等的部分。在某些情况下，如胚胎早期，ER与有丝分裂纺锤体微管的相互连接可能有利于平均地将ER分成两部分。图3.47描绘的便是其中一个例子。

ER生物合成的另一个还很不清楚的主要方面就是ER组分彼此相互融合的机制[由于待融合的两个膜来自同一细胞器，这一过程被称为同型融合（homotypic fusion)]。除了在ER网络的形成中需要同型融合外，有丝分裂后核膜的重新组装及两个单倍体细胞交配时（在酵母中是**karyogamy**）的核融合也都需要同型融合。核融合似乎需要许多与ER-高尔基体融合所需的同样的蛋白质（NSF、SNARE、ATPase以及一些G蛋白）。核融合需要一些翻译后易位子的组件而不是形成通道的组件，这一点很独特(KAR2，即BiP在酵母中的同源物，最初是在它参与核融合时被鉴定出来的）。核融合过程中这些蛋白质的作用还不清楚。其中一个假说认为它们并没有介入到核融合本身而是参与调节其他蛋白质的易位这一过程。

3.26 信号序列也用于定向运输蛋白质到其他细胞器

关键概念

- 信号序列用来引导到达或通过易位穿过其他细胞器的膜。
- 线粒体和叶绿体都由双层膜包围，每层膜的脂双层都含有它特有类型的易位子。
- 有两种不同的通路能够引导基质蛋白到达过氧化物酶体。

蛋白质易位到ER的原则也应用于蛋白质易位到其他细胞器。这对核（见第5章细胞核结构和运输）、线粒体、叶绿体和过氧化物酶体都是适用的。通过对蛋白质转移到这些不同细胞器过程的分析比较，揭示出信号序列和通道是蛋白质分选的普遍机制。

几乎所有的线粒体和叶绿体蛋白质都由核基因编码并且在细胞质中翻译（这两种细胞器的基因组只编码一小部分蛋白质，这些蛋白质在细胞器中合成）。过氧化物酶体和核的蛋白质也在胞质中合成。与那些注定要到达ER的蛋白质一样，这些蛋白质必须被运送到各自的靶细胞器并且穿过这些细胞器的膜。图3.48显示了这些蛋白质之所以能够被特异性地投放到不同的细胞器中，可能是因为这些蛋白质都使用了显著不同的信号序列。每一种信号序列都被一个靶向系统和细胞器独特的通道所识别。这些细胞器的大多数组分都彼此没有关联，这表明蛋白质的定向运动和输入是在各种不同的场合进化的。

各种细胞器的定位信号

细胞器	信号	信号定位
ER	MDPPRPALLALPALLLLLLAGARA...	N端
细胞核	...LAEADRKRRGEFRKE...	内部的
线粒体	MLSNLRILLNKAALRKAHTSMVRNFRYGKPVQ...	N端
叶绿体	MRTRAGAFFGKQRSTSPSGSSTSASRQWLRSSPGRTQRPAAHRVLA...	N端
过氧化物酶体-PTS1	...VVVGGGTPSRL	C端
过氧化物酶体-PTS2	MNLTRAGARLQVLLGHLGRP...	N端

疏水的　酸性的　碱性的

图 3.48　将目标蛋白定位于不同细胞器的一些代表性信号序列。这些序列的长度和在蛋白质中的位置都明显不同，带电氨基酸和疏水氨基酸的分布也不同。这些差异导致了这些蛋白质具有不同的物理性质从而能够加以区分。

3.27　蛋白质输入到线粒体中起始于在线粒体外膜上识别其信号序列

关键概念

- 线粒体有一层内膜和一层外膜，每一层膜都有易位复合体。
- 蛋白质向线粒体输入发生在翻译后。
- 线粒体信号序列被外膜上的受体识别。

人们相信线粒体是由原核细胞进化而来的，这些细胞被其他更大的细胞吞食，最后导致了这两种细胞的共生关系，如图 3.49 所示。作为这一进化关系的结果，线粒体由两层膜而不是一层膜包围。注定要到线粒体内部（**mitochondrial matrix，线粒体基质**）的蛋白质必须穿过两层膜以及这两层膜之间的空间（**the intermembrane space，膜间空间，膜间隙**）。每一层膜上都有不同的多蛋白复合体跨越其间，它包括一个易位通道。**TOM（translocase of the outer membrane）**复合体横跨外膜，**TIM（translocase of the inner membrane）**复合体横跨内膜。这两种复合体在两层膜之间的特定接触点相互连接，但是它们能各自独立活动。

线粒体蛋白是在翻译后定向到膜的，这一过程需要其 N 端通常 20～25 个氨基酸长的信号序列被识别。线粒体信号序列富含碱性氨基酸（即带正电荷）和疏水氨基酸。这段序列形成了中极两性的螺旋（amphipathic helixe）结构，带电残基在一边而疏水残基在另外一边。线粒体蛋白的信号序列首先被 Tom20 识别，这是一种膜整合蛋白，是 TOM 复合体的一个组分。Tom20 通过一段窄沟结合到信号序列疏水面上（不像 SRP 那样是通过一段柔韧的深沟结合到信号序列上）。如图 3.50（见图版）所示，信号序列与 Tom20 之间的相互作用比较微弱，作用位置在结合口袋外部的信号序列带正电的残基上。然后，信号序列与 TOM 复合体之间的相互作用被第二种蛋白质加强，这种蛋白

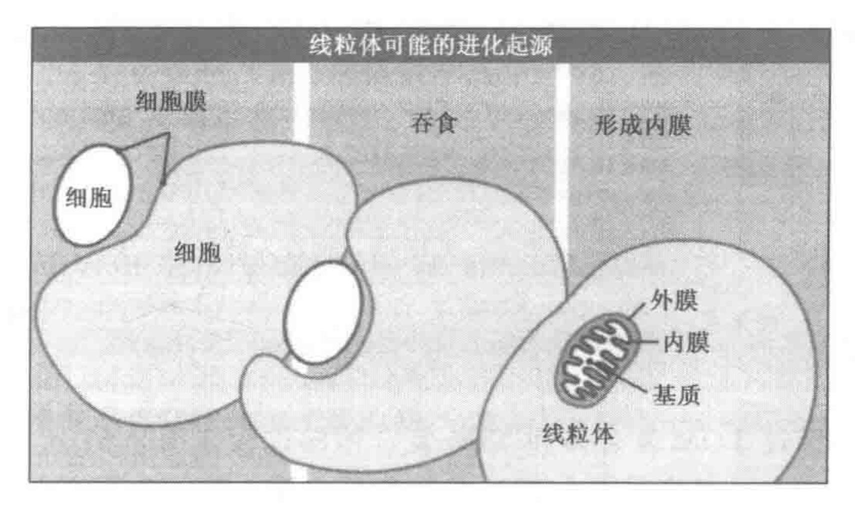


图 3.49 线粒体可能是从原核细胞进化而来的，这些细胞被其他更大的细胞吞食而形成了线粒体，特化为产生能量的细胞器。这能够解释为什么它是被双层膜包围并且具有自己的基因组。

质称为 Tom22。Tom22 含有一个酸性的细胞液结构域，与信号序列暴露出来的碱性面相互作用。这两种相互作用主要导致了蛋白质被带去与 TOM 复合体接触。在靶向运动过程中，线粒体蛋白通过与细胞液 hsp70 联结而保持未折叠状态，并具有易位的能力。

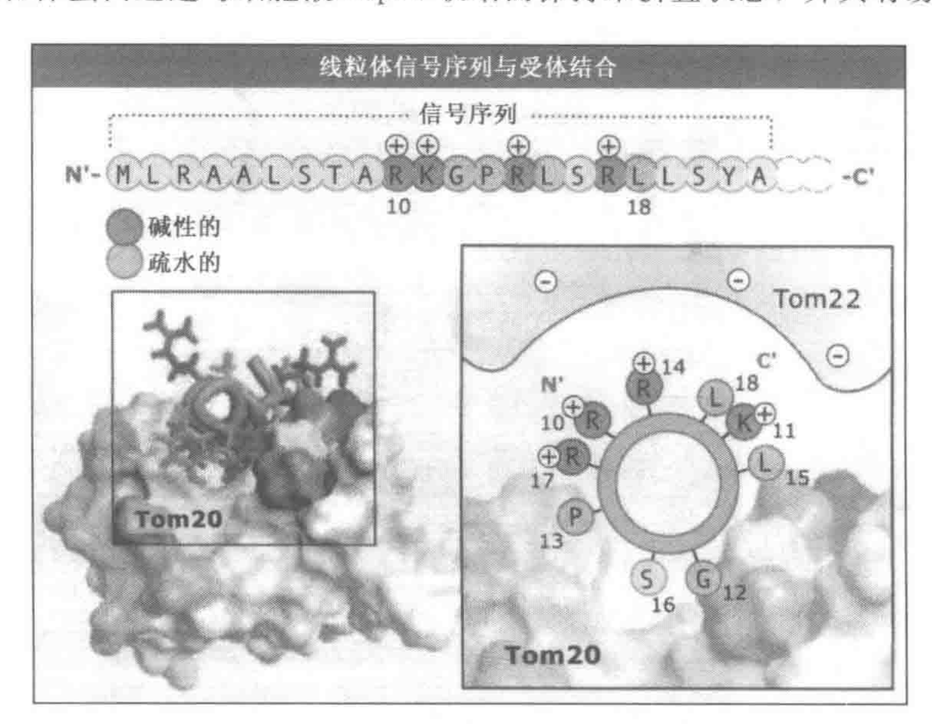


图 3.50 线粒体的信号序列在蛋白质排列成螺旋构象时具有碱性表面和疏水表面。在图的上方显示典型的线粒体信号序列，右图是螺旋结构的末端视角。蛋白质的疏水表面与 Tom20 中的疏水裂缝相互作用；其正电氨基酸与 Tom22 的酸性结构域相互作用。左图中 Tom22 结合到信号序列上，黄色代表蛋白质的疏水表面。照片由 Kyushu 大学的 Daisuke Kohda 惠赠。复制自 *Cell*，vol. 100，Abe，Y.，et al.，Structural Basis of Presequence…，pp. 551-560。Copyright 2000，获得 Elsevier 许可。

3.28 线粒体内膜和外膜中的复合体在线粒体蛋白的输入过程中相互合作

关键概念

- TOM 复合体与 TIM 复合体之间有实体的联系，被输入的蛋白质从一个复合体到另一个复合体直接通行。
- 线粒体基质内的 hsp70 和跨内膜的膜电位为蛋白质的输入提供能量。

线粒体蛋白穿过 TOM 复合体和 TIM 复合体的过程如图 3.51 所示。除了 Tom20 和 Tom22 之外，TOM 复合体还包括一些其他蛋白质，Tom40 可能形成实际的通道。目前，关于易位的蛋白被通道识别和通道的门控都还未研究清楚。然而，在蛋白质进入通道之后，蛋白质的碱性信号序列可能被静电作用吸引到位于 Tom22 和 TIM 复合体蛋白 Tim23 的膜间隙中的酸性结构域上。Tom22 和 TIM 相互靠近保证了蛋白质在二者之间穿行，不需要蛋白质先脱离复合体来到膜间隙中。已有证据表明 Tim23 的 N 端整合到了外膜中，其 N 端将 TIM 和 TOM 复合体紧密联系在一起，这有利于肽链有效率地转移。TIM50 也被认为在引导蛋白前体从 TOM 复合体到 TIM23 通道中发挥作用。

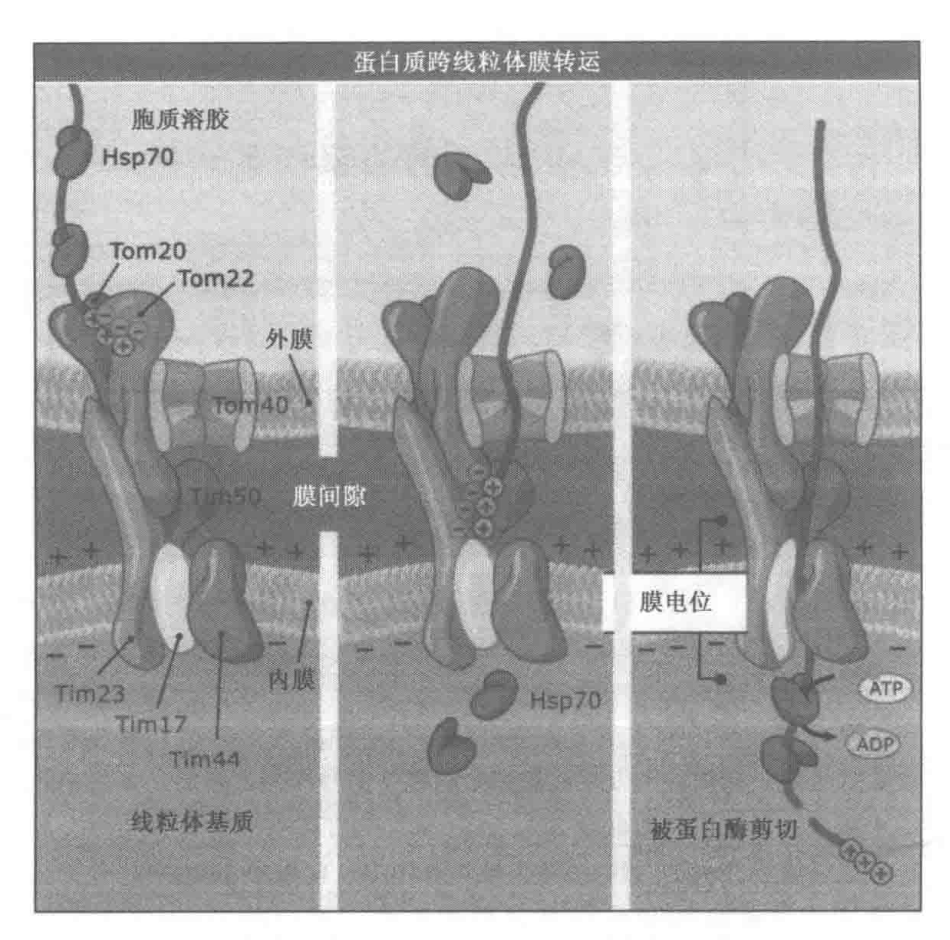


图 3.51 注定要转移到线粒体基质中的蛋白质在线粒体外膜上被识别，并且直接穿过外膜和内膜中的通道。当蛋白质到达基质中时，信号序列被切除。蛋白质的转移是由线粒体基质中的蛋白伴侣水解 ATP 以及跨内膜的膜电位驱动的。Tim23 蛋白被整合到两层膜中并连结膜中的通道。

在肽链停泊到TIM复合体（主要由Tim23、Tim17、Tim44组成，其中通道可能由前两者构成）上之后，两股力量将肽链运送到基质中。基质中的hsp70同源物mtHsp70通过与Tim44相互作用与通道相连。在蛋白质翻译后易位进入ER时，蛋白质从通道中一出现mtHsp70就结合到上面，显然在此过程中起着棘齿（ratchet）或马达或二者皆有的作用（见3.9 ATP水解驱动蛋白质易位）。它如何起作用可能依赖于被易位的底物本身。线粒体上跨内膜的电化学电位也有利于多肽的易位，这种作用可能是通过与带正电的信号序列相互作用而产生的。电位方向是横跨膜的，有利于带正电的物体向基质中移动。然而，电位到底是如何帮助易位的仍然不清楚。在进入线粒体基质中后，大多数信号序列被可溶性线粒体加工蛋白酶（mitochondral processing protease，MPP）切除。

与整合到ER膜的蛋白质一样，线粒体膜蛋白常常用一段未被剪切掉的内部信号序列进行定向，这段信号序列包含了蛋白质整合的指令，是一段疏水氨基酸的形式。跨膜结构域如何被识别并被整合到两层膜中还不清楚。将要整合到内膜的蛋白质被定向到一个由Tim22、Tim54和Tim18组成的替补易位子（alternate translocon）上。蛋白质从TOM复合体到达这个易位子上要靠膜间隙中被称作“小Tims”的小蛋白质协助。图3.52就描述了这一过程。关于这些通路的其他方面还知之甚少。

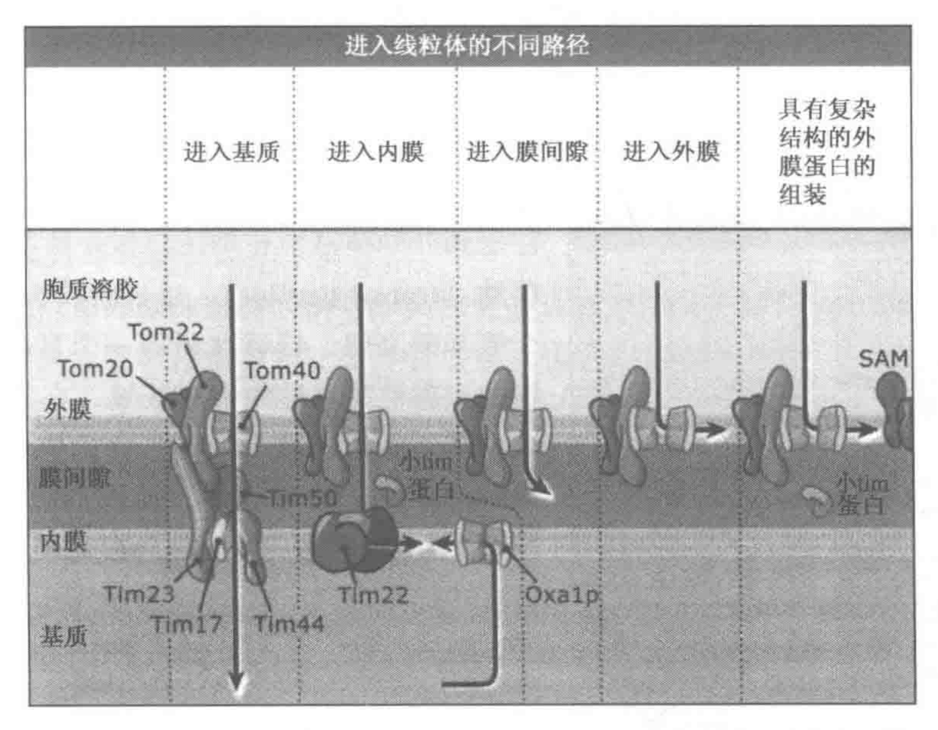


图3.52　不同的路径用来将不同的蛋白质输入到线粒体中不同的部位。TOM复合体在不同的通路中都起作用，但内膜中的复合体是特化的。有两种方式能使蛋白质到达内膜。有一些内膜蛋白质同时采用了两种方式：首先被转移到基质中然后再返回插入到膜中。

无论是由核基因编码还是线粒体基因编码的内膜蛋白都能够通过一个包含内膜蛋白Oxalp的通路被整合。细胞核基因编码的内膜蛋白首先穿过两层膜到达基质。此后，指导蛋白质输入的信号序列就会从蛋白质上切除，随后第二段序列指导蛋白质返回到内膜上，通过Oxalp将其整合。线粒体基因编码的蛋白由线粒体基质中的核糖体合成，然后

通过 Oxalp 通路直接整合到内膜中。关于 Oxalp 通路的细节目前还未完全清楚。

人们已经鉴定出线粒体中另一个易位子，被称作 SAM 复合体（外膜中用于分选与组装的装置）。尽管其组成和作用机制还有待进一步阐明，但已知它有助于外膜蛋白的易位和整合，它通过 β 链而不是通常的 α 螺旋跨膜。与 Tim22 复合体一样，SAM 复合体似乎也依赖于小 Tim 来引导底物从 TOM 通道中出来。

一个饶有趣味的问题是内膜蛋白如何能不经过整合而绕过外膜。这种特性可能来自内膜蛋白和外膜蛋白跨膜结构域之间的差别，这种差别使得内膜蛋白不被 TOM 整合装置识别。而 TIM 复合体能够在 TOM 复合体有机会将这些内膜蛋白整合到外膜之前识别出这些内膜蛋白。目前，关于 TOM 复合体和 TIM 复合体的门控、调节和协调还未完全研究清楚。尽管它们行使的许多功能与 ER 中的易位子类似，但这些机制之间到底有多么相似还有待考证。

3.29 蛋白质输入叶绿体时也必须跨过两层膜

关键概念

- 蛋白质输入到叶绿体发生在翻译后。
- 叶绿体的内膜和外膜有分隔的易位复合体，二者在蛋白质的输入过程中相互协作。

与线粒体一样，叶绿体也具有双层膜。蛋白质易位到叶绿体内部（**stroma，叶绿体基质**）的过程与蛋白质转移到线粒体基质中的过程类似，如图 3.53 所示。蛋白质是在翻译后易位到叶绿体中的，这一过程需要胞质 hsp70 参与来阻止蛋白质在转移前折叠。注定到叶绿体基质中的蛋白质一般都含有 N 端**转移肽（transit peptide）**，这一肽段长度在 20～120 个氨基酸之间。转移肽还有一个富含丝氨酸、苏氨酸和碱性氨基酸的中心区域，在其 C 端还有一个中级两性的区域。编码蛋白质定向转运到叶绿体的信息位于转移肽中。前蛋白通过 Toc34p 停泊在 **TOC 复合体**（叶绿体外膜的易位子）上。然后被转移到由 Toc75 形成的通道中，Toc75 也可以识别转移肽。已有证据表明 Toc75 可能与不同的辅助蛋白联结，辅助蛋白的种类取决于被易位的底物类型，其中高含量的光合蛋白使用一个通道，含量低的持家蛋白使用了另一种替换通道。

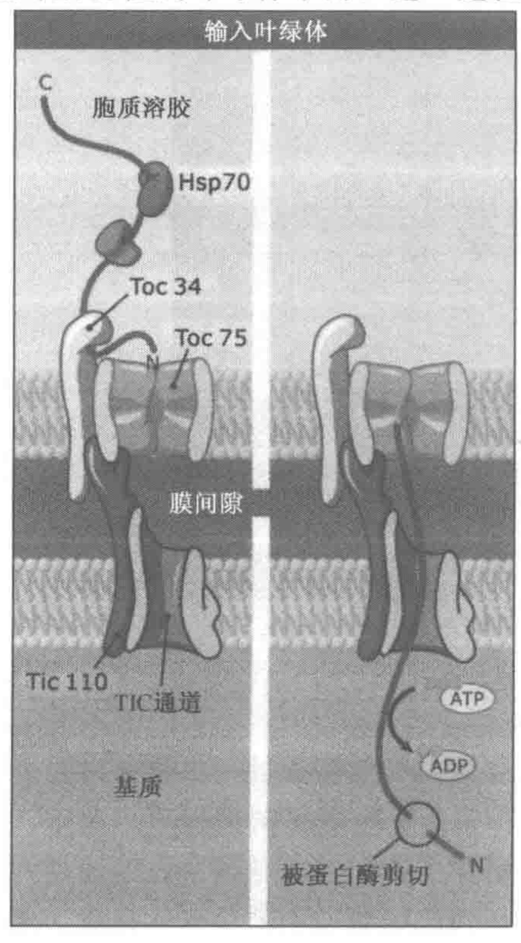


图 3.53 叶绿体蛋白必须穿过两层膜才能进入叶绿体基质。被输入的蛋白质受到细胞液中蛋白伴侣的作用而保持未折叠状态。蛋白质穿过内膜和外膜相连的通道进入基质中。当蛋白质进入后，它们的转移肽被切除。这一输入过程需要能量供应，但具体能量来源还没有确定。

因此，不同底物需要不同的辅助因子来促进它们的易位这一概念并不仅限于 ER 的蛋白易位过程。

蛋白质通过 **TIC 复合体**（叶绿体内膜的易位子）穿过内膜。TOC 和 TIC 复合体相互联结在一起，并被认为同时被蛋白底物占据。TIC 复合体，包括其通道的鉴定，远不如 TOC 复合体清楚。蛋白质通过这两个复合体进入基质所需的能量来源还不清楚。与线粒体不同，叶绿体没有跨内膜的电化学电位来帮助驱动蛋白质输入。所以一定存在着另一个能量来源。有可能是叶绿体基质将 ATP 水解产生能量。然而，也有可能使用另一种完全不同的机制。当被输入的蛋白质到达叶绿体基质时，转移肽被叶绿体加工酶（CPE）切除。

除了外膜和内膜外，叶绿体内部还含有一种被称为类囊体（thylakoid）的膜性细胞器。类囊体膜围成一种独特的隔室，隔室中有很多与光合作用相关的酶。这些蛋白质大多数是在胞质溶胶中合成并被输入到类囊体中。当第二个信号序列（仅用于蛋白质已转运到叶绿体基质）被与细菌 SecYEG 易位子有关系的装置识别后，蛋白质穿过类囊体膜进行转运，（见 3.9 ATP 水解驱动蛋白质易位）。

大约有一半易位到类囊体腔中的蛋白质利用了 Tat（twin-arginine-translocation）系统。虽然 Tat 易位的机制并不清楚，但 Tat 依赖的信号序列与 ER 的靶向信号显得非常相似，除了疏水性不如后者强，且含有两个相邻的精氨酸，“Tat”即由此命名。蛋白质穿过类囊体膜的易位完全依赖于膜两边的 pH 梯度的维持，但形成梯度的的原因还不清楚。

Alb3 是线粒体内膜蛋白 Oxalp 的同源物，它负责将蛋白质整合进类囊体膜。蛋白质被定向到 Alb3 装置上是通过与叶绿体基质中的一个 SRP 同源物相互作用进行的。Alb3 蛋白如何行使功能目前还不清楚。

线粒体蛋白和叶绿体蛋白的信号序列都普遍具有中极两性的特性，在植物细胞的胞质溶胶中如何区分线粒体蛋白和叶绿体蛋白呢？也许因为植物中的 Tom22 变体缺少酸性细胞液结构域，这表明为了保证蛋白质被正确定位。植物已经进化出某种与酵母和哺乳动物不同的线粒体识别模式。

3.30 蛋白质在被运进过氧化物酶体之前先进行折叠

关键概念

- 过氧化物酶体的信号序列在胞质溶胶中被识别并被定向运输到易位通道。
- 过氧化物酶体的蛋白质在折叠后才被输入。
- 识别过氧化物酶体信号序列的蛋白质在输入和进出过氧化物酶体的循环中始终与信号序列结合在一起。
- 过氧化物酶体的膜起源于从 ER 出芽。

与 ER、线粒体及叶绿体一样，那些要到过氧化物酶体中的蛋白质也要被定向运送并且直接易位到过氧化物酶体中。过氧化物酶体由单层膜构成，参与了一些氧化过程，如脂肪酸的氧化和过氧化氢的产生等。过氧化物酶体与线粒体及叶绿体不一样，它没有自己的基因组，故所有的过氧化物酶体的蛋白质都是从细胞液中输入的。在确定过氧化

物酶体起源于ER之前，关于它的起源一直有一些争论。从ER上出芽而形成的过氧化物酶体前体只含有很少的过氧化物酶体的装置，该细胞器的大部分蛋白质都是在出芽后输入的。

注定要到过氧化物酶体内部或**过氧化物酶体基质（peroxisomal matrix）**中的蛋白质，可能在翻译后通过两种通路之一定向转移。其中一条通路使用了蛋白质C端的过氧化物酶体定向信号（peroxisomal targeting signal，PTS1）。最简单的PTS1序列要比大多数其他细胞器的信号序列小很多，常常只包含有三个氨基酸。与其他输入信号一样，它们的序列有所不同（一致的序列是一个丝氨酸、半胱氨酸或丙氨酸后面接着一个碱性氨基酸，然后是一个亮氨酸）。PTS1序列外的另一个氨基酸序列能增强定向信号，尤其当信号序列不是很严格时会如此。PTS1蛋白被Pex5p定向运送到过氧化物酶体，Pex5p是一种胞质蛋白，能够结合到定向序列（targeting sequence）上。PTS2蛋白比PTS1蛋白更为少见，它的定向信号更长一些，这段信号序列通常位于蛋白质的N端。这一定向序列是一个更长的肽链的一部分，该肽链在蛋白质转运到基质后被切除。PTS2蛋白被另一种胞质蛋白Pex7p识别和定向。在哺乳动物中，Pex5p有选择的剪切形式也能够调节PTS2的定向。如图3.54所示，PTS1和PTS2通路中具有共同的膜组分，包括一种至少由三个蛋白质Pex17p、Pex14p和Pex13p构成的停泊复合体。然而，每条通路也有一些独特的蛋白因子。还可能存在其他的不依赖PTS1和PTS2的通路，将蛋白质定向运输到过氧化物酶体基质中，但关于这些通路还没有清楚的解释。

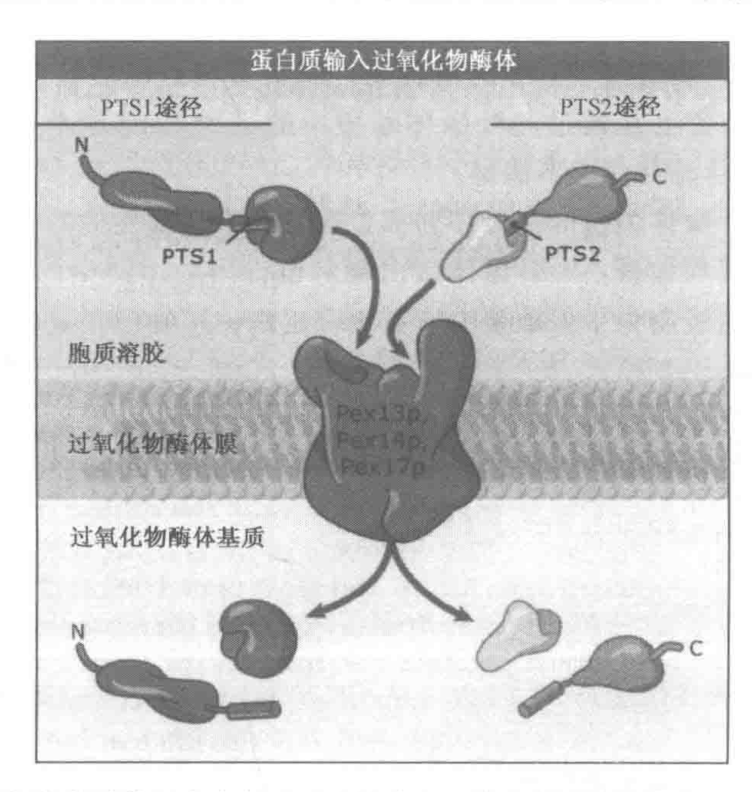


图3.54　过氧化物酶体蛋白在折叠后才被输入，并且被两种通路中的一种识别。这两种通路都使用了通道的一些组件，但是还有一些它特有的组件。识别过氧化物酶体信号序列的蛋白质也随着输入蛋白一起进入到过氧化物酶体中。

尽管过氧化物酶体基质蛋白输入的机制还没有被充分地描述，但是这种机制至少在一个主要方面明显地不同于ER、线粒体和叶绿体的蛋白质易位：进入其基质的蛋白质

能在胞质中折叠后，甚至寡聚化之后被输入。这一点得到了明确的论证，如图 3.55 中阐述的，该实验用 9nm 的金颗粒包被 PTS1 多肽。尽管这种颗粒很大，它们还是能够被输入到基质中。在这一方面，蛋白质输入过氧化物酶体基质可能类似于通过核孔复合体的转运（见第 5 章细胞核的结构和运输）。此外，在细胞核和过氧化物酶体的转运中，识别信号序列的受体与易位底物一同被运送过膜。此后受体被单独运输出来再使用。如果过氧化物酶体膜如同核膜那样对蛋白质和小分子运动是可透过的，其内部环境将对细胞产生毒性。因此，过氧化物酶体的易位通道必须被十分严格地控制住，以保证其内含物不会扩散到该细胞器外。但这种控制是如何完成的还不清楚。

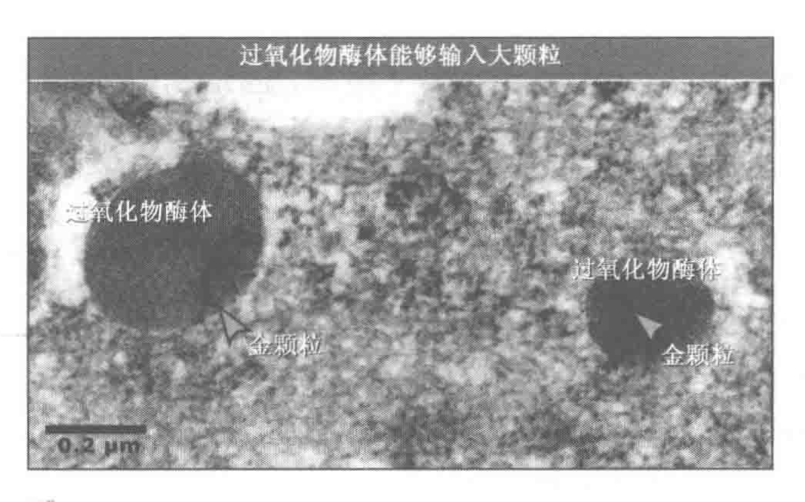


图 3.55 电镜照片显示包被有金颗粒的 PTS1 肽段输入到过氧化物酶体中。金颗粒的直径为 9nm，比大多数的球蛋白要大。照片由 Walton, P. A., et al. *Mol. Biol. Cell*. June, 1995. 6 (6): 675-683。Copyright© 1995 American Society of Cell Biology 惠赠。

与那些完全易位进去的同类物相比，过氧化物酶体膜蛋白可能采用了一条截然不同的输入通路。一些蛋白质，包括 Pex19p、Pex3p 和 Pex16p，都被认为参与了这一通路，Pex19p 可能作为输入受体。然而，这些蛋白质的作用还不清楚。

3.31 展望

本章用大量的篇幅阐述了蛋白质怎样跨过 ER 膜易位，主要因为对 ER 的这一功能细节了解得最多。分泌性蛋白易位的基本途径是相当明确的。然而，对更多的复杂底物的易位还缺乏了解。尤其是对膜蛋白的整合不完全了解。跨膜区域如何取向，是什么决定它们何时整合进膜？在整合之前，TM 区域中有多少相互作用发生？现在有些问题逐渐清楚了，如易位是被调节的过程，在这一过程中，蛋白质靶向、易位及整合的效率，以及这些活动所需要的因子，随着底物的不同，以及从一种细胞状态到另一种状态而显著地变化。但对于易位怎样被调节，细胞怎样根据需要更改它还缺乏理解。

甚至易位通道本身的结构现在还不知道，易位子的契合（engagement）及门控机制尚在研究。信号序列的识别怎样导致通道结构改变？通道结构是否有足够的柔曲性使易位的肽链能重新取向或使多跨膜结构域积聚一起？当易位终了时通道结构处有什么事件发生？在易位子附近活动的所有蛋白质何时又是怎样与易位子联结的？

比易位更不明确的是ER进行蛋白质折叠和处理错误折叠蛋白的方法。这个过程最基础的方面——细胞器如何"感知"蛋白折叠得恰当还是不恰当——几乎完全不清楚。关于蛋白伴侣具体怎样与蛋白质相互作用还需要很多信息。ER中的多陪伴系统相互作用到什么程度，以及它们是独自发挥功能还是部分重叠的，这些也是需要澄清的问题。另外，也不清楚是如何决定"一个蛋白质不像是正确折叠，应该被降解"的。认为存在"多次与蛋白伴侣相互作用"这样一种机制是一个有吸引力的想法，但是关于它可能是怎样运作的还没有证据。最后，不知道一个已被选去降解的蛋白质是怎样被重新定向到通道，并被运回胞质溶胶的，或者，甚至确实有这样一种机制使通道能从内部激发而打开。

ER在脂类合成和分选中的作用甚至更不明确。部分原因是研究脂分子比研究蛋白质难得多，因为脂类很难进行实验操作。关于脂类分布的最根本问题——脂类如何从ER选择性地转运到靶膜——仍然是争论的主题。ER和其他细胞器之间的实体联系的发现，如线粒体相关膜，提示了一种可能的转移机制。然而，就在这一点上，这类接触的作用还未确立。也不清楚ER怎样调控特定的磷脂合成。

最后，控制ER整体动态的机制尚不明了，细胞器如何保持它独特的空间？怎样维持它的亚区？它与细胞骨架的关系是什么，以及它怎样在细胞各处运动？它的大小怎样决定，需要时怎样扩张？未折叠蛋白应答（unfolded protein response）的发现表明了ER和细胞核之间的交流，这可能会影响ER的某些行为。ER与其他隔室（细胞器）的接触提示它可能也与它们交流，但目前还不知道交流如何发生。

3.32 总结

细胞内有许多细胞器，有些细胞器直接从胞质溶胶输入蛋白质。线粒体、叶绿体和过氧化物酶体输入蛋白质为它们自己所用。内质网（ER）也从胞质溶胶输入蛋白质，但是这些蛋白质大多数被送去分泌，或送到那些自己不能够输入蛋白质的细胞器和膜去为它们所用。这包括质膜和分泌途径或胞吞途径的细胞器。

已经确定蛋白质是通过信号序列输入细胞器的，信号序列是一小段氨基酸，通常位于蛋白质的N端。针对各个细胞器的信号序列长度和化学特性不同。用于ER的信号序列通常大约为20个氨基酸长，有一段长的连续的疏水氨基酸残基。线粒体信号序列长度大约相同。然而，它们是疏水氨基酸和带电氨基酸交替，以便当信号序列卷曲成α螺旋时，一侧是疏水的另一侧是带电荷的。过氧化物酶体信号序列一般只有3个氨基酸长。在所有的情况下，是信号序列的物理性质而不是它的准确的序列使得它被识别，并指定蛋白质的目的地。每种信号序列都是通过与受体结合被识别的，这样使蛋白质靶向到特定的细胞器。蛋白质到达后即通过膜上的通道易位进入该细胞器内部。信号序列被识别是在蛋白质合成期间还是之后，决定发生的是哪一种类型的易位。共翻译易位是信号序列被识别时，蛋白质还在合成。这导致正在合成蛋白质的核糖体结合到膜上，在这里核糖体将新生的蛋白质转移进易位通道。翻译后易位是信号序列在蛋白质合成完成之后被识别的。

大多数蛋白质通过共翻译易位进入ER，在信号序列从核糖体露出之后，很快信号识别颗粒（SRP）就与信号序列结合，通过SRP与SRP受体之间的相互作用，核糖体

及新生的蛋白质被靶定到ER膜上。然后核糖体和新生肽链占据通道，蛋白质经通道跨膜。通道的核心由Sec61复合物组成，中央是一组参与易位的蛋白质。这些组分合在一起称做易位子，与信号序列的相互作用打开了通道，新生肽链得以插入，据推测这种插入方式能阻止其他分子通行。当核糖体还结合在通道上，蛋白质穿过通道进入腔内时，翻译仍继续进行。

当蛋白质的跨膜结构域被翻译并进入通道时，蛋白质开始整合进ER膜。跨膜结构域被通道识别是因为它们的疏水性，它被允许穿过通道壁进入脂双层。跨膜结构域的识别引起新生肽链的跨膜运动停止。翻译继续，将多肽的后续区段释放到胞质溶胶中。带有多跨膜结构域的膜蛋白的完全整合似乎需要通道反复地打开和关闭。

膜蛋白整合的问题因需要依它们与膜的关系进行取向而复杂化。方向显然是由蛋白质的跨膜结构域的性质决定的。然而，还不清楚跨膜结构域怎样与通道、膜脂或它们彼此相互作用来决定蛋白质的方向。

一些蛋白质以翻译后方式易位进入ER。当蛋白质被靶向运送时，它们与伴侣分子结合，以制止这些蛋白质折叠，保持它们的易位能力。蛋白质通过将它们的信号序列结合到易位通道的Sec61上而实现靶向（targeting）。通道与共翻译易位中使用的通道一样，但含有四个另外的蛋白质，包括Sec62和Sec63。新生蛋白穿过这个通道移动，是ATP被ER腔中的BiP蛋白水解的结果。BiP利用ATP水解来结合和释放位于通道腔末端的新生蛋白。BiP分子的长时间结合足以起到棘齿（ratchet）作用，将蛋白质移进腔中。

许多蛋白质当它们易位进ER时被共价修饰。在新生蛋白插入通道后不久，信号序列即被信号肽酶去除，在易位蛋白进入腔内后，它们的后续区段常常很快就被修饰，寡糖基转移酶给它加上糖，或者可能经蛋白二硫键异构酶（PDI）催化形成二硫键。少数已充分易位的蛋白在靠近N端处被切割，接上糖基磷脂酰肌醇（GPI），这是一种磷脂，能将蛋白质锚定到膜上。

进入腔内之后，在一大群蛋白伴侣的帮助下蛋白质开始折叠。BiP和GrP94直接与具有未折叠形式的蛋白质相互作用。钙联结蛋白和钙网质蛋白结合到糖上，这些糖是易位时加到蛋白质上的，并参与一个循环，该循环中蛋白质上存在或不存在葡萄糖残基指明该蛋白质是否正确折叠。当蛋白质试图折叠时，PDI重排二硫键。正确折叠后，蛋白质就不再与蛋白伴侣相互作用，被准许离开ER转到高尔基体。如果经反复努力仍未能正确折叠，或者未能跟其他蛋白质恰当地组装，该蛋白质就被转回易位通道，经逆行易位回到胞质溶胶。在那里该蛋白质被蛋白酶体降解。

大量未折叠蛋白在ER中积聚会引发未折叠蛋白应答，这是一个从ER到核的信号通路（signaling pathway），它刺激生成追加的蛋白伴侣。信号由ER驻留跨膜蛋白介导，它能感觉从BiP脱离下来的未折叠蛋白的存在。这种脱离导致信号级联反应活化，它改变了基因表达型式（pattern），使ER能处理过量的未折叠蛋白，或者在更高等的真核生物中，如果严格的ER应激反应持续，则导致细胞死亡。

线粒体和叶绿体是翻译后才输入蛋白质的。这两种细胞器都具有两层膜。蛋白质可以定位在任一层膜上，定位在膜间空间或细胞器内部。每一层膜上都有分隔开的易位子。在线粒体外膜上的叫做TOM，在内膜上的叫做TIM，而在叶绿体对应膜上的是

TOC 和 TIC。信号序列被外膜上的易位子识别。内膜和外膜上的易位子有实体上的联系，以便输入的蛋白质能够直接在它们之间转移。线粒体蛋白能跨过两层膜易位，然后由一段分隔的信号序列引导重新定向到内膜。分隔的信号序列也可以使叶绿体蛋白继续跨过内部的叫做类囊体的细胞器的膜易位。

在线粒体中，易位既被跨内膜的电化学梯度驱动，也被正在输入的蛋白质与线粒体基质中的蛋白伴侣之间的相互作用所驱动。叶绿体中如何驱动易位还不知道。我们也不知道蛋白质是怎样被整合进这两种细胞器的膜中的。

蛋白质进入过氧化物酶体是翻译后转运方式，但是不同于进入任何其他细胞器的那种易位。蛋白质输入过氧化物酶体仅需跨过单层膜，并且发生在蛋白质在胞质溶胶中折叠之后。过氧化物酶体转运序列在胞质溶胶中被蛋白质识别，这些蛋白质在易位时仍然保持与底物的结合。在它们到达该细胞器内之后，载体蛋白分离下来回到胞质溶胶去重新利用。过氧化物酶体膜蛋白的来源不是很清楚。

ER 除了在蛋白质的输入、成熟和分布方面起主要作用之外，在细胞中还有许多作用。它的各种不同的功能反映在它的结构中。蛋白质的易位和成熟发生在粗面 ER，它被结合的核糖体覆盖。

粗面 ER 分支出去成为光面 ER。光面 ER 通常呈管状，形成恒定地重新排列的网，延伸遍及胞质溶胶。光面 ER 往往与细胞中的骨架元件相联系。为细胞所有的膜合成脂类是光面 ER 的功能。脂类必须以某种方式从 ER 转运到其他膜上，但这是如何做到的还不清楚。光面 ER 与其他膜的接触对此提出了一条可能的路线。ER 也可能作为细胞内的钙储存地点。在应答来自细胞外的信号时钙被释放出来，之后又被泵回细胞器。在特化的细胞中，光面 ER 也可以合成脂溶性激素或将潜在的有害化学物质降解。在 ER 的任一种功能发生了特化的细胞中，如分泌大量蛋白或合成类固醇激素，粗面 ER 和光面 ER 会扩张占据大量胞质空间。其他高度特化的细胞，如骨骼肌细胞，ER 在成分和结构两方面高度特化。肌质网就是特化的光面 ER，成片状包绕着肌原纤维，以便释放钙来刺激肌肉收缩。

参考文献

3.2 蛋白质穿过内质网膜易位进入分泌途径（概述）

综述

Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A., 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* v. 286 p. 1882–1888.

Johnson, A. E. and van Waes, M. A., 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 799–842.

Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A., 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* v. 92 p. 381–390.

Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U., 1996. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 65 p. 271–303.

3.3 蛋白质使用信号序列定向到内质网来进行易位

综述

Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., and Walter, P., 2001. The signal recognition particle. *Annu. Rev. Biochem.* v. 70 p. 755–775.

研究

Blobel, G. and Dobberstein, B., 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* v. 67 p. 835–851.

Lingappa, V. R., Chaidez, J., Yost, C. S., and Hedgpeth, J., 1984. Determinants for protein localization: beta-lactamase signal sequence directs globin across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 456–460.

von Heijne, G., 1985. Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* v. 184 p. 99–105.

3.4 信号序列被信号识别颗粒（SRP）识别

研究

Keenan, R. J., Freymann, D. M., Walter, P., and Stroud, R. M., 1998. Crystal structure of the signal sequence-binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* v. 94 p. 181–191.

3.5 信号识别颗粒与其受体相互作用使蛋白质停泊在内质网膜上

研究

Egea, P. F., Shan, S. O., Napetschnig, J., Savage, D. F., Walter, P., and Stroud, R. M., 2004. Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature* v. 427 p. 215–221.

Focia, P. J., Shepotinovskaya, I. V., Seidler, J. A., and Freymann, D. M., 2004. Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science* v. 303 p. 373–377.

Raden, D., Song, W., and Gilmore, R., 2000. Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *J. Cell Biol.* v. 150 p. 53–64.

Rapiejko, P. J. and Gilmore, P. J., 1997. Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 89 p. 703–713.

Snapp, E. L., Reinhart, G. A., Bogert, B. A., Lippincott-Schwartz, J., and Hegde, R. S., 2004. The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Cell Biol.* v. 164 p. 997–1007.

3.6 易位子是一种引导蛋白质通过的水性通道

综述

Johnson, A. E., van Waes, M. A., 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 799–842.

Pohlschroder, M., Prinz, W. A., Hartmann, E., and Beckwith, J., 1997. Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* v. 91 p. 563–566.

研究

Crowley, K. S., 1994. Secretory proteins move through the ER membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* v. 78 p. 461–471.

Crowley, K. S., Reinhart, G. D., and Johnson, A. E., 1993. The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* v. 73 p. 1101–1115.

Deshaies, R. J., and Schekman, R., 1987. A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* v. 105 p. 633–645.

Esnault, Y., Blondel, M. O., Deshaies, R. J., Scheckman, R., and Kepes, F., 1993. The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* v. 12 p. 4083–4093.

Gorlich, D., and Rapoport, T. A., 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* v. 75 p. 615–630.

Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T. A., 1994. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.* v. 13 p. 3973–3982.

Simon, S. M. and Blobel, G., 1991. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 65 p. 371–380.

Van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A., 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* v. 427 p. 36–44.

3.7 大多数真核生物的分泌性蛋白和膜蛋白其翻译和易位是耦联的

综述

Brodsky, J. L., 1998. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Int. Rev. Cytol.* v. 178 p. 277–328.

Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U., 1996. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 65 p. 271–303.

研究

Jungnickel, B., and Rapoport, T. A., 1995. A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* v. 82 p. 261–270.

Kim, S. J., Mitra, D., Salerno, J. R., and

Hegde, R. S., 2002. Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. *Dev. Cell* v. 2 p. 207–217.

Rutkowski, D. T., Lingappa, V. R., and Hegde, R. S., 2001. Substrate-specific regulation of the ribosome-translocon junction by N-terminal signal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 7823–7828.

3.8 一些蛋白质翻译后才进行定向移动和易位

综述

Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A., 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* v. 92 p. 381–390.

Rapoport, T. A., Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B., and Staeck, O., 1999. Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol. Chem.* v. 380 p. 1143–1150.

研究

Hann, B. C., and Walter, P., 1991. The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* v. 67 p. 131–144.

Panzner, S., Dreier, L., Dreier, E., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T. A., 1995. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* v. 81 p. 561–570.

Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G., and Schekman, R., 1989. Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* v. 109 p. 2641–2652.

3.9 ATP水解驱动蛋白质易位

研究

Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T. A., 1999. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* v. 97 p. 553–564.

Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., and Voos, W., 1999. The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* v. 97 p. 565–574.

3.10 跨膜蛋白穿出易位通道进入膜脂双层中

综述

Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A., 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* v. 92 p. 381–390.

研究

Do, H., Do, H., Lin, J., Andrews, D. W., and Johnson, A. E., 1996. The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* v. 85 p. 369–378.

Heinrich, S. U., Mothes, W., Brunner, J., and Rapoport, T. A., 2000. The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* v. 102 p. 233–244.

Liao, S., Lin, J., Do, H., and Johnson, A. E., 1997. Both lumenal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* v. 90 p. 31–41.

Mothes, W., Heinrich, S. U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., and Rapoport, T. A., 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 89 p. 523–533.

Van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A., 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* v. 427 p. 36–44.

Yost, C. S., Lopez, C. D., Prusiner, S. B., Myers, R. M., and Lingappa, V. R., 1990. Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* v. 343 p. 669–672.

3.11 跨膜蛋白的方向在它们被整合到膜中时就已经决定了

综述

Hegde, R. S., and Lingappa, V. R., 1997. Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 91 p. 575–582.

研究

Borel, A. C. and Simon, S. M., 1996. Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. *Cell* v. 85 p. 379–389.

Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E., and Johnson, A. E., 1997. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* v. 89 p. 535–544.

Kim, P. K., Janiak-Spens, F., Trimble, W. S.,

Leber, B., and Andrews, D. W., 1997. Evidence for multiple mechanisms for membrane binding and integration via carboxyl-terminal insertion sequences. *Biochemistry* v. 36 p. 8873–8882.

3.12 信号序列由信号肽酶切除

综述

Martoglio, B., and Dobberstein, B., 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* v. 8 p. 410–415.

研究

Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y., 2000. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* v. 272 p. 417–428.

3.13 脂性GPI添加到某些易位后的蛋白质上

综述

McConville, M. J., and Menon, A. K., 2000. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). *Mol. Membr. Biol.* v. 17 p. 1–16.

Udenfriend, S., and Kodukula, K., 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* v. 64 p. 563–591.

3.14 许多蛋白质在易位时发生糖基化

综述

Helenius, A., and Aebi, M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* v. 291 p. 2364–2369.

Parodi, A. J., 2000. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* v. 348 Pt 1 p. 1–13.

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Damian-Matsumura, P., and Dias, J. A., 1999. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* v. 11 p. 205–215.

3.15 分子伴侣帮助新易位的蛋白质折叠

综述

Argon, Y., and Simen, B. B., 1999. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 10 p. 495–505.

Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A., 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* v. 286 p. 1882–1888.

Gething, M. J., 1999. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 10 p. 465–472.

3.16 蛋白二硫键异构酶在蛋白质折叠时保障形成正确的二硫键

综述

Freedman, R. B., Hirst, T. R., and Tuite, M. F., 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* v. 19 p. 331–336.

Huppa, J. B., and Ploegh, H. L., 1998. The eS-Sence of -SH in the ER. *Cell* v. 92 p. 145–148.

Wittrup, K. D., 1995. Disulfide bond formation and eukaryotic secretory productivity. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 6 p. 203–208.

研究

Frand, A. R., and Kaiser, C. A., 1999. Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* v. 4 p. 469–477.

Pollard, M. G. and Weissman, J. S., 1998. Ero1p: A novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* v. 1 p. 171–182.

Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., and Rapoport, T. A., 2001. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* v. 104 p. 937–948.

Tu, B. P., Ho-Schlever, S. C., Travers, K. J., and Weissman, J. S., 2000. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* v. 290 p. 1571–1574.

Weissman, J. S., and Kim, P. S., 1993. Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulphide isomerase. *Nature* v. 365 p. 185–188.

3.17 钙联结蛋白/钙网织蛋白陪伴系统识别糖类修饰

综述

Helenius, A., and Aebi, M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* v. 291 p. 2364–2369.

3.18 蛋白质组装成复合物的过程受到监控

综述

Reddy, P. S., and Corley, R. B., 1998. Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays* v. 20 p. 546–554.

研究

Molinari, M., and Helenius, A., 2000.

Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* v. 288 p. 331–333.
Walmsley, A. R., Batten, M. R., Lad, U., and Bulleid, N. J., 1999. Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 14884–14892.

3.19 ER中错误折叠的蛋白质最终被返回胞质溶胶中降解

综述

Kopito, R. R., 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* v. 10 p. 524–530.
Plemper, R. K., and Wolf, D. H., 1999. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* v. 24 p. 266–270.
Romisch, K., 1999. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J. Cell Sci.* v. 112 p. 4185–4191.
Suzuki, T., Yan, Q., and Lennarz, W. J., 1998. Complex, two-way traffic of molecules across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* v. 273 p. 10083–10086.
Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, T. A., 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 246–255.

研究

Lilley, B. N., and Ploegh, H. L., 2004. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* v. 429 p. 834–840.
Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R., 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* v. 83 p. 121–127.
Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L., 1996. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* v. 84 p. 769–779.
Wiertz, E. J., et al., 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* v. 384 p. 432–438.
Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T. A., 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* v. 429 p. 841–847.

3.20 ER与细胞核之间的通讯阻止未折叠的蛋白质在腔中积聚

综述

Gething, M. J., 1999. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 10 p. 465–472.
Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J., 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 20–28.
Sidrauski, C., Chapman, R., and Walter, P., 1998. The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol.* v. 8 p. 245–249.

研究

Cox, J. S., Shamu, C. E., and Walter, P., 1993. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* v. 73 p. 1197–1206.
Harding, H. P., et al., 2001. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk-/-* mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* v. 7 p. 1153–1163.
Harding, H. P., et al., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* v. 11 p. 619–633.
Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K., 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* v. 10 p. 3787–3799.
Scheuner, D., et al., 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and *in vitro* glucose homeostasis. *Mol. Cell* v. 7 p. 1165–1176.
Travers, K. J., et al., 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* v. 101 p. 249–258.
Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K., 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* v. 107 p. 881–891.

3.21 ER合成大部分细胞磷脂

综述

Sakai, J., and Rawson, R. B., 2001. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr.*

Opin. Lipidol. v. 12 p. 261–266.
Vance, D. E., and Vance, J. E., eds., 1996. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. Amsterdam: Elsevier.

研究

DeBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Li, W. P., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., and Espenshade, P. J., 1999. Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* v. 99 p. 703–712.
Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Espenshade, P. J., 2000. Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* v. 102 p. 315–323.
Vance, J. E., 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* v. 265 p. 7248–7256.

3.22 脂类必须由ER运到其他细胞器的膜上

综述

Kang, S., and Davis, R. A., 2000. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1529 p. 223–230.
Staehelin, L. A., 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* v. 11 p. 1151–1165.
Trotter, P. J., and Voelker, D. R., 1994. Lipid transport processes in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1213 p. 241–262.

3.23 膜的脂双层中，内层与外层脂类组成不同

综述

Daleke, D. L., and Lyles, J. V., 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1486 p. 108–127.

研究

Helenius, J., Ng, D. T., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A., and Aebi, M., 2002. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* v. 415 p. 447–450.

3.24 ER按其形态和功能可以再进行细分

综述

Sitia, R. and Meldolesi, J., 1992. Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol. Biol. Cell* v. 3 p. 1067–1072.
Szabadkai, G. and Rizzuto, R., 2004. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett.* v. 567 p. 111–115.
Vertel, B. M., Walters, L. M., and Mills, D., 1992. Subcompartments of the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Biol* v. 3 p. 325–341.

3.25 ER是一个动态的细胞器

综述

Galili, G., 2004. ER-derived compartments are formed by highly regulated processes and have special functions in plants. *Plant Physiol.* v. 136 p. 3411–3413.
Powell, K. S., and Latterich, M., 2000. The making and breaking of the endoplasmic reticulum. *Traffic* v. 1 p. 689–694.
Thyberg, J., and Moskalewski, S., 1998. Partitioning of cytoplasmic organelles during mitosis with special reference to the Golgi complex. *Microsc. Res. Tech.* v. 40 p. 354–368.
Vitale, A., and Ceriotti, A., 2004. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? *Plant Physiol.* v. 136 p. 3420–3426.

研究

Cox, J. S., Chapman, R. E., and Walter, P., 1997. The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* v. 8 p. 1805–1814.
Dreier, L., and Rapoport, T. A., 2000. *In vitro* formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J. Cell Biol.* v. 148 p. 883–898.
Jones, A. L., and Fawcett, D. W., 1966. Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver). *J. Histochem. Cytochem.* v. 14 p. 215–232.
Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J., 2003. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* v. 163 p. 257–269.
Terasaki, M., 2000. Dynamics of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus during early sea urchin development. *Mol. Biol. Cell* v. 11 p. 897–914.
van Anken, E., Romijn, E. P., Maggioni, C., Mezghrani, A., Sitia, R., Braakman, I., and Heck, A. J., 2003. Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody

secretion. *Immunity* v. 18 p. 243–253.

3.27 蛋白质输入到线粒体中起始于在线粒体外膜上识别其信号序列

综述

Lithgow, T., 2000. Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett.* v. 476 p. 22–26.
Pfanner, N., 2000. Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr. Biol.* v. 10 p. R412–R415.

研究

Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D., 2000. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* v. 100 p. 551–560.

3.28 线粒体内膜和外膜中的复合体在线粒体蛋白的输入过程中相互合作

综述

Koehler, C. M., 2000. Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.* v. 476 p. 27–31.
Koehler, C. M., 2004. New developments in mitochondrial assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 20 p. 309–335.
Luirink, J., Samuelsson, T., and de Gier,J. W., 2001. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* v. 501 p. 1–5.
Shore, G. C., et al., 1995. Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur. J. Biochem.* v. 227 p. 9–18.

研究

Donzeau, M., et al., 2000. Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* v. 101 p. 401–412.
Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., and Voos, W., 1999. The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* v. 97 p. 565–574.

3.29 蛋白质输入叶绿体时也必须跨过两层膜

综述

Jarvis, P., and Robinson, C., 2004. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* v. 14 p. R1064–R1077.
Luirink, J., Samuelsson, T., and de Gier,J. W., 2001. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* v. 501 p. 1–5.
Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J., and Lithgow, T., 2000. How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from *Arabidopsis* differ from their fungal counterparts. *Plant Physiol.* v. 123 p. 811–816.
Robinson, C., and Bolhuis, A., 2004. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1694 p. 135–147.
Schleiff, E., and Soll, J., 2000. Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* v. 211 p. 449–456.

3.30 蛋白质在被运进过氧化物酶体之前先进行折叠

综述

Hettema, E. H., Distel, B., and Tabak, H. F., 1999. Import of proteins into peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1451 p. 17–34.
Titorenko, V. I., and Rachubinski, R. A., 1998. The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* v. 23 p. 231–233.

研究

Dammai, V., and Subramani, S., 2001. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* v. 105 p. 187–196.
Hoepfner, D., Schildknegt, D., Braakman, I., Philippsen, P., and Tabak, H. F., 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* v. 122 p. 85–95.
Walton, P. A., Hill, P. E., and Hill, S., 1995. Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Biol. Cell* v. 6 p. 675–683.

连慕兰　桑建利　译

第4章　蛋白质在膜之间的运输

Graham Warren 和 Ira Mellman
Department of Cell Biology，Ludwig Institute for Cancer Research，Yale University School of Medicine，New Haven，CT

本章概要

4.1　导言

关键概念

- 真核细胞内有一个精细的膜系统，由生物膜围成的结构组成，这些结构称作细胞器。
- 每个细胞器有独特的糖蛋白和糖脂成分，并行使特定的功能。
- 一种细胞器包括一个或多个由生物膜围成的隔室。
- 细胞器可以独立地或者协同地完成给定的功能。
- 在胞吞和胞吐途径中，荷载蛋白通过运输小泡在隔室间转移，该小泡从一个细胞器表面出芽，随后融入受者隔室的靶膜。

- 运输小泡能选择性地接纳预定要转移的物质而拒绝必须驻留在细胞器中的物质，并从此细胞器出芽。
- 选择性地吸收物质入运输小泡，是由蛋白质的氨基酸序列或碳水化合物结构形成的信号保障的。
- 运输小泡含有某些蛋白质，它们特异地引导小泡到达预定的目的地，在此锚定和融合。

真核细胞的鲜明特征之一，是存在一个由内膜围成的，被称作**细胞器**（**organell**）的结构所组成的复杂系统。此外，所有的活细胞外面都有一层作为边界的膜双层，真核细胞内部被膜围成许多独具功能的**隔室**（**compartment**）。隔室化的一个优势是使细胞有行使众多不同功能所需的特定环境，这些功能有各自不同的化学需求。

图 4.1 说明了真核细胞中典型的各种膜性细胞器及其组织形式，这是一个动物细胞（也见第 3 章蛋白质的膜定向转移和第 5 章细胞核结构与转运）。每个细胞器由一个或多个隔室组成。例如，**内质网**（**endoplasmic reticulum，ER**）是单个隔室，而**高尔基体**（**Golgi apparatus**）则包括一系列膜性隔室，它们具有各自不同的生物化学功能。线粒体有两个隔室，基质（内腔）和膜间空间（外腔），它们分别含有一组性质截然不同的大分子。

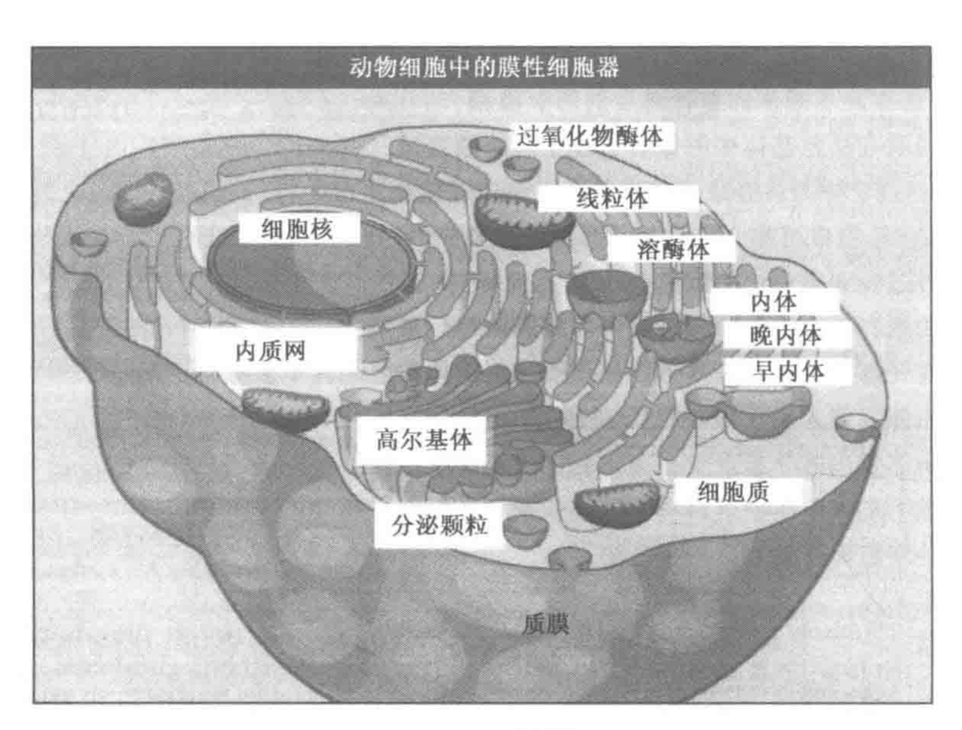


图 4.1 动物细胞中由膜围成的隔室。

胞质溶胶（**cytosol**）可以看作一个单独的隔室，外周围着**质膜**（**plasma membrane**），内里与所有细胞器的外表面相接触。**细胞质**（**cytoplasm**）包括胞质溶胶和细胞器。同样的，核质被内核膜包围。

每个细胞器都有独特的蛋白质（包括膜结合蛋白和可溶性蛋白）和脂类成分，还有其他与细胞器功能相协调的分子。一些蛋白质和脂有共价结合的寡糖链。当细胞生长和分裂的时候，必须合成新的组分来供细胞器生长、分裂，以及最终均分到两个子细胞中。在分化、发育及对外界环境刺激，例如压力，作出应答时，细胞器成分仍然在合

成。然而，这些成分的合成并非必须发生在它们进行功能活动的细胞器中，而是在特定的合成位点产生不同的大分子。例如，大多数蛋白质在胞质溶胶中的核糖体上合成，胞质溶胶有最适宜的环境，有利于核糖体活动和蛋白质生成。

这样就产生了一个问题：细胞器的成分是怎样到达它们功能活动场所的呢？自 20 世纪 70 年代以来，在细胞生物学领域里这就是一个极重要的问题。如图 4.1 所总结的，这里至少有八种主要的细胞器，每种细胞器含有成百上千种性质截然不同的蛋白质和脂类，它们都必须穿越胞质溶胶到达它们的目的细胞器，多数蛋白质是在胞质溶胶中合成的，它们怎样被投放到相关的细胞器？或者，在分泌性蛋白的情况下，这些蛋白又是怎样排出细胞之外的？在许多情况下答案是，有那么一类连接在蛋白质上的信号，被特别地称作**分选信号（sorting signal）**或者靶向信号（targeting signal），这些信号是氨基酸短序列，存在于待定位的蛋白质上而不是在胞质溶胶中（见 4.5 信号介导的蛋白质运输和批量蛋白质运输概念）。每个目的地与一种或多种不同类别的信号相关联（脂类投放的细节见 3.22 脂类必须由内质网运到其他细胞器的膜上）。

分选信号被特定的细胞机构识别，沿着一定的路径一步步地将蛋白质带到最终目的地。如图 4.2 所示，两条主要的转运路径是**胞吐途径（exocytic pathway）**或称分泌途径，和**胞吞途径（endocytic pathway）**，它们转运**物质（cargo）**出入细胞（见 4.2 胞吐途径概述；4.3 胞吞途径概述）。所有新合成的蛋白质，包括要从细胞分泌出去或者将为细胞器所用的，在胞吐和胞吞途径中有一个共同点，即穿入内质网膜。蛋白质跨膜易位的信号叫做信号序列（见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。本章我们将讨论分选信号，这些信号将蛋白质引向它们的目的地。

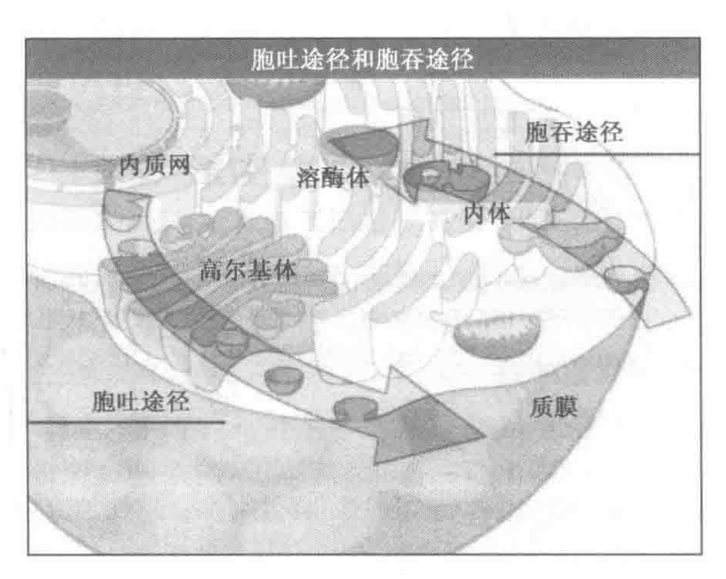


图 4.2　胞吐途径及胞吞途径。胞吐途径由内质网（包括核被膜）和高尔基体（此处以一个单独的高尔基堆作为代表）组成。胞吞途径包括早内体、晚内体和溶酶体。

一旦进入内质网，蛋白质便不再自由地穿过细胞质移动；它们接近其他膜性细胞器的唯一方法是通过**膜泡介导的运输（vesicle-mediat transport）**。**运输小泡（Transport vesicle）**主要由蛋白质和脂类组成，被认为通过从膜出芽（budding）形成，如图 4.3 所示（见 4.4 膜泡介导的蛋白质运输的概念）。出芽之后，运输小泡跟路径中的下一个目

标房室相融合，最初生成小泡的隔室称作**供者隔室**（**donor compartment**）或起始隔室（originating compartment），而目的地（或靶）隔室通常称作**受者隔室**（**acceptor compartment**）。

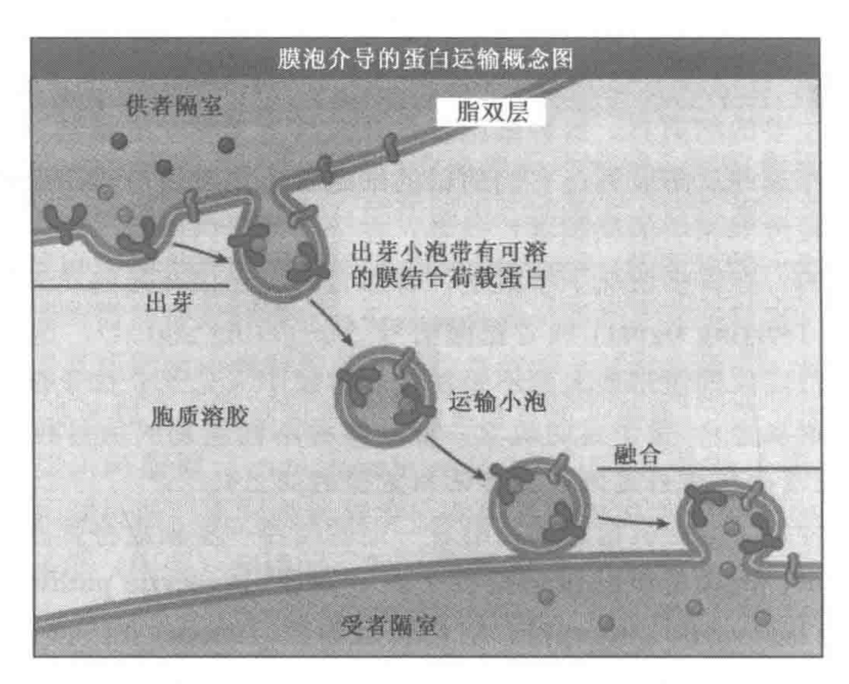


图 4.3　在膜泡介导的运输中，由膜围成的小泡从一个隔室出芽，与另一个隔室融合。

如图 4.4 所示，在胞吐或胞吞路途上，运输小泡携带由内质网来的物质直接或间接地到达所有其他隔室。胞吞依赖于在质膜处形成小囊泡。这些小泡转运已内化的物质到**内体**（**endosome**），从内体又产生另外的小泡运送物质到其他隔室。这样，运输小泡的成分就依它们的来源和目的地而有所不同。

膜泡介导的运输，对交换膜泡的细胞器来说，带来一个根本性的问题，为了行使功能，细胞器需要保持它们的组成成分，但是当膜泡在它们之间来回搬运物质的时候，该怎么办呢？计算转运的规模便可知这一问题之大。与整个质膜的蛋白质和脂质等量的物质能在一小时之内通过胞吞途径上的细胞器。这个速率是巨大的，跟合成一个新细胞器所需要的时间相比，后者典型的是一天。

对这一问题的回答是在转运过程中采用“选择性”机制。出芽泡能选择性地结合蛋白质进行转运，留下细胞器的驻留蛋白。随后膜泡停泊并选择性地与路径上下一个正确的隔室融合。为了在细胞器之间保持自动平衡，膜泡运输通常实际上必须是双向的（见图 4.4），以便供者隔室不会因为连续地转运到受者隔室而消耗掉。在另一个转运路径中，再循环机制使一些膜泡成分返回供者隔室去为它所用。由于选择性并不完美，补救机制能使未留意而从供者隔室逃逸的驻留蛋白返回（见 4.7 从内质网逃逸的驻留蛋白被回收）。

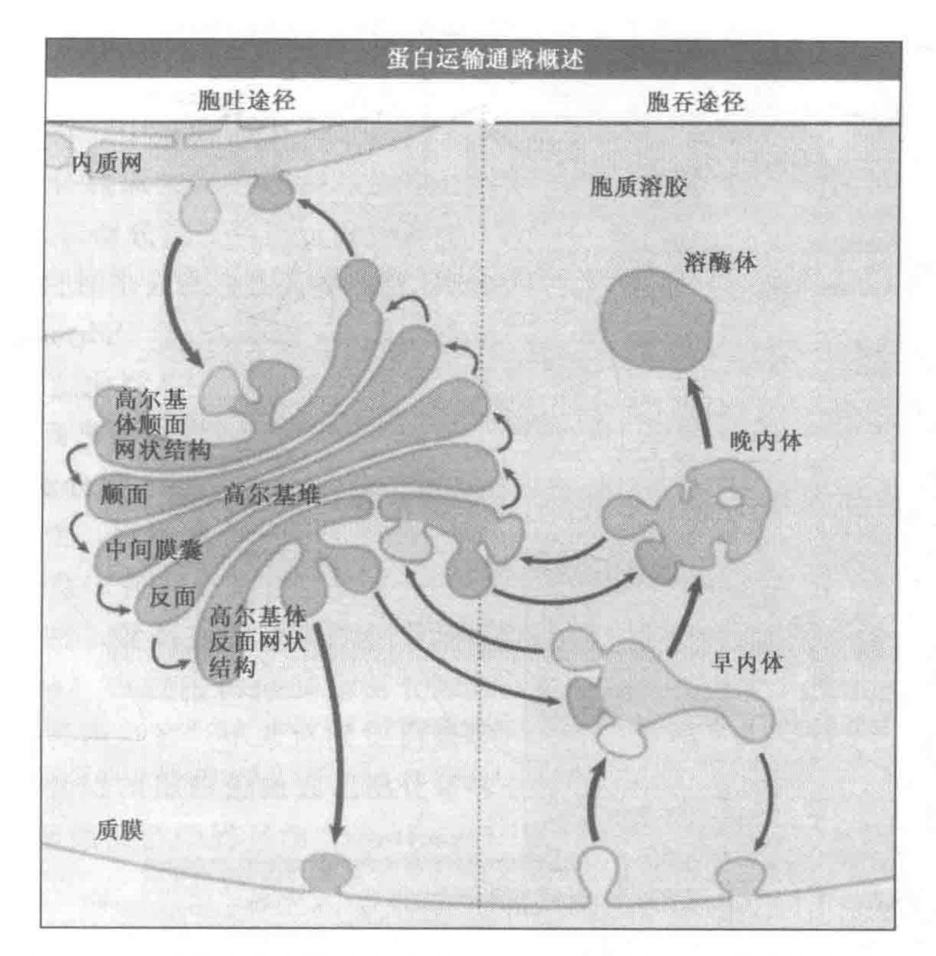


图 4.4 典型的动物细胞中蛋白质移动的已知途径。几乎所有的流动路径都是双向的。

4.2 胞吐途径概述

关键概念

- 所有真核细胞的核心分泌房室都有同样的定员编制：内质网、高尔基体的隔室和后高尔基运输小泡（post-Golgi transport vesicle）。
- 从机体到机体，一类细胞到另一类细胞，参与分泌的细胞器数量和组织形式都不同。
- 在分泌途径中，每种细胞器有其特定的功能。
- 内质网是蛋白质合成和恰当折叠的场所。
- 在高尔基体中，蛋白质被修饰、分拣，由后高尔基运输小泡运送到正确的目的地。
- 物质转运到质膜可直接地通过一种基本的过程，或间接地通过一种可调节过程进行。后者包括物质暂时地储存在分泌颗粒中，直到细胞接收到适当的刺激信号。

胞吐途径是某些分子采用的路径，其目的地是质膜或细胞外。这条途径原先叫做分泌途径，因为它最初是在胰腺细胞中得到明确揭示的，胰腺细胞分泌消化道酶，这些酶占合成的蛋白质的一大部分。Palade 及其同事根据这一事实去追踪这些蛋白质所走的路线。他们做了脉冲示踪实验（pulse-chase），在这个实验中，胰腺组织切片和放射性标记的氨基酸共温育，用生物化学的分级分离技术和放射自显影跟踪带放射性标记的蛋

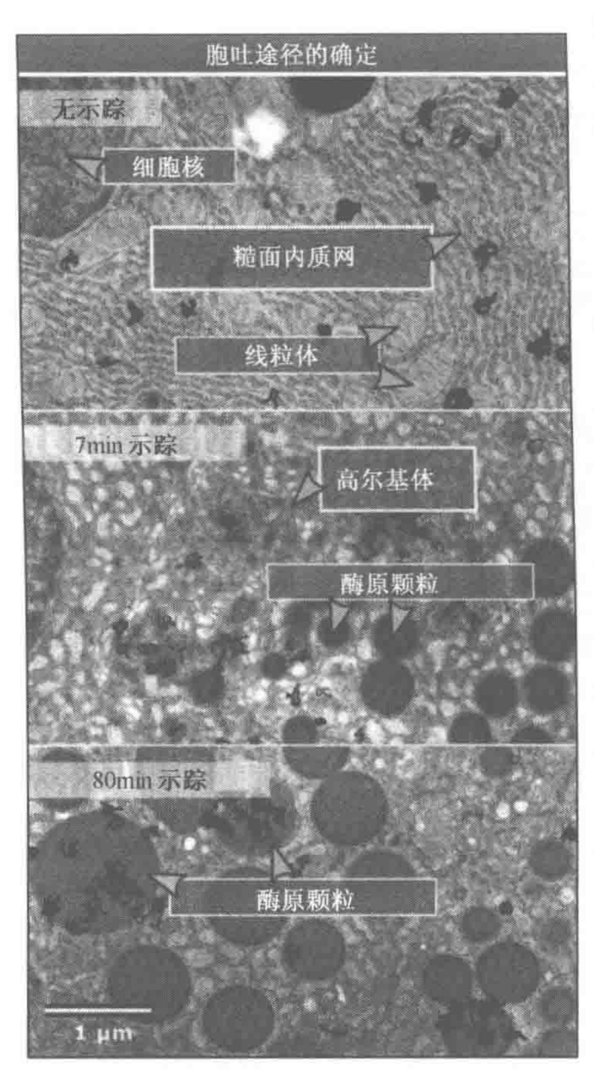


图 4.5　通过研究酶原颗粒的生物发生对分泌途径作出解释。胰腺切片在固定前的 0、7、80min 用^{3}H-亮氨酸作短暂的脉冲标记，制备样品做电镜放射自显影观察。放射自显影颗粒代表新合成的分泌性蛋白，最先遍布内质网（上图），然后分布在高尔基体（中图）和分泌性酶原颗粒中（下图）。上图：复制自 *The Journal of Cell Biology*，1967，vol. 34，p. 597，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可；下图复制自 *The Journal of Cell Biology*，1971，vol. 48，p. 503，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。所有照片由 Yale 大学医学院的 James D. Jamieson 惠赠。

白质的位置。他们发现，消化酶在内质网合成，移动到高尔基体，如图 4.5 所示。随后发现此酶出现在浓缩颗粒中，它成熟为酶原颗粒，靠近沿导管排列的那部分质膜，导管输送酶到小肠。在**调节型分泌（regulated secretion）**过程中，消化酶只在细胞接收到适当刺激时才释放，如同激素（hormone）那样，它是直到摄取食物时才经消化道释放（调节型分泌的细节见 4.19 某些细胞储存蛋白质用于分泌）。对比之下，**基本型分泌（constitutive secretion）**是这样一种过程，蛋白质被连续地分泌出来。它在那些只有一点点或者没有调节型分泌的细胞中占优势。例如肝细胞，连续地分泌诸如血清白蛋白（serum albumin）等蛋白质到血浆中。在这两种分泌中，含有将被分泌出去的蛋白质的膜泡在被称作**胞吐（exocytosis）**的过程中与质膜融合，如图 4.6 所示。

在胰腺细胞中的分泌途径的组织形式展示于图 4.7。内质网是一个单独的隔室，带有一些独特的区域，对分泌而言最重要的是糙面内质网（RER）。RER 之所以“粗糙”，是因为其表面附着正在合成分泌性蛋白的核糖体，这些蛋白跨过膜双层转移到内质网腔（见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。在细胞深处较为靠近细胞核的部位，内质网的扁囊部分（flattened cisternal element）群集在一起。在这些细胞中，大量的内质网单元提供了充足的核糖体结合以及蛋白质转移的位点，来支持上千万消化酶的合成和转移，这些酶每分钟都在合成。在大多数真核细胞中，内质网膜是数量最庞大的膜。甚至在非特定进行分泌的细胞中，典型情况下内质网膜也占细胞膜总量的约 50%。

新合成的蛋白质由内质网转运到高尔基体，它是一种多隔室的细胞器（见图 4.4）。它的核心形状是**高尔基堆（Golgi stack）**，它由紧密并列的扁平膜囊或称小池（cisternae）组成。高尔基堆有极性，它包括顺面膜囊（*cis* cisternae）、中间膜囊（medial cisternae）和反面膜囊（*trans* cisternae）。顺面膜囊是高尔基体的最靠近的进入面（entry face），而反面膜囊是最靠近的出口面（exit

face)。膨大的膜囊边缘是运输小泡出芽的部位，也是小泡与膜囊融合的部位。

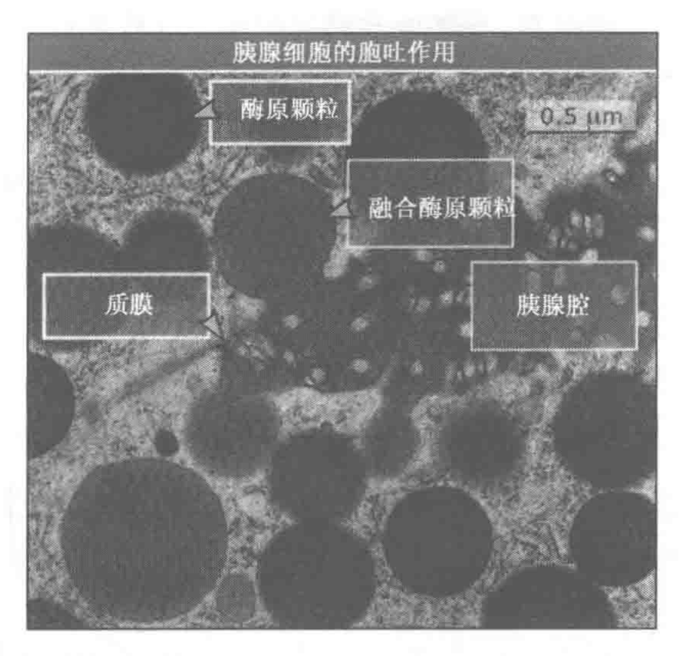


图 4.6 透射电镜照片，显示一个酶原颗粒与质膜融合。酶原颗粒的内含物释放到胰腺腔。照片由瑞士 Geneva 大学的 Lelio Orci 惠赠。

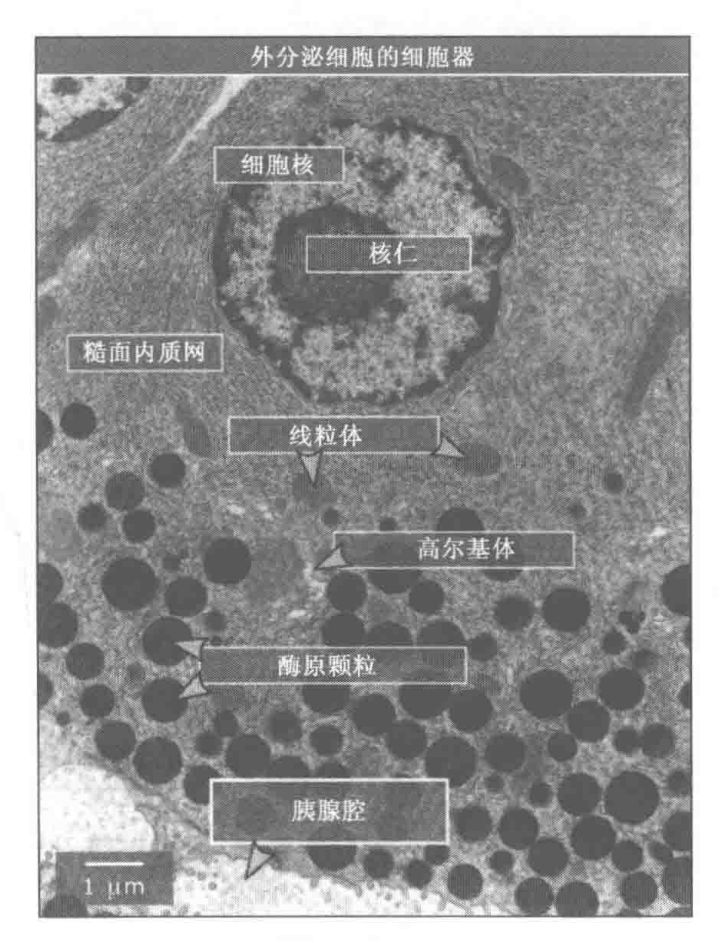


图 4.7 胰腺细胞中的细胞器透射电镜照片。其中的分泌途径包括粗面内质网、高尔基体和酶原颗粒。在这些细胞中，粗面内质网和酶原颗粒特别地丰富。照片由瑞士 Geneva 大学的 Lelio Orci 惠赠。

高尔基堆含有各种各样的酶，可以对大多数转运物质进行翻译后修饰。最具特征性的是修饰蛋白质上 *O*- 连接和 *N*- 连接的寡糖类的酶。这些寡糖有许多功能，包括使新合成的溶酶体酶定向投入溶酶体（见 3.14 许多蛋白质在易位时发生糖基化和 4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构）。

图 4.8 显示 *N*- 连接途径，在内质网中添加**高甘露糖寡糖链（high mannose oligosaccharide）**的修饰步骤是以逐步分段的方式完成的，它导致有序的转化，使“未成熟的”高甘露糖寡糖链成为复杂的高度唾液酸化（sialylated）的结构。大体上催化这些步骤的酶有序地跨高尔基堆分布着。在这个过程的早期起作用的酶，似乎更多地在高尔基体的最早接收由内质网来的蛋白质的这一表面被找到。晚期起作用的酶（例如那些添加最后的唾液酸残基的酶），则被发现于成熟的分泌性蛋白出高尔基体的那一面。

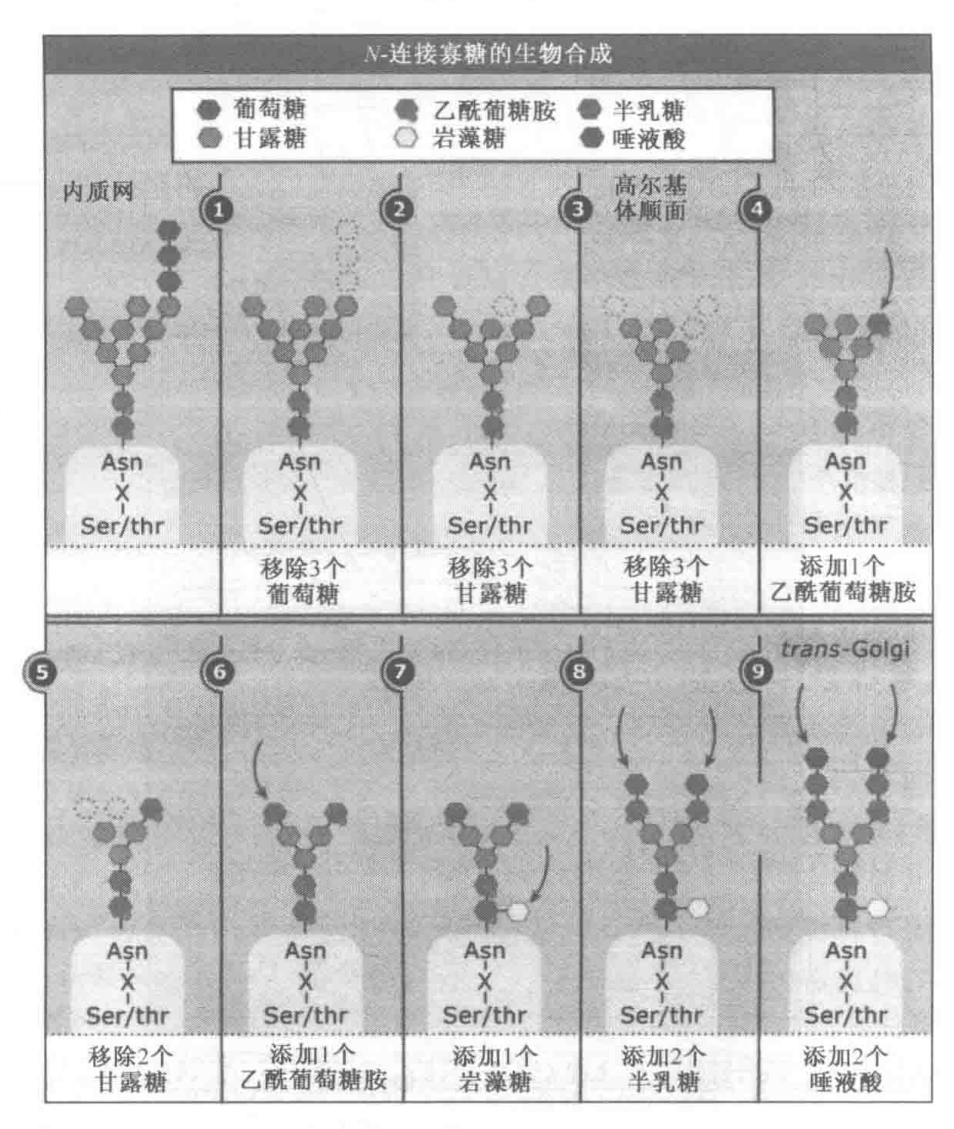


图 4.8　*N*-连接寡糖链形成的步骤。由膜泡介导的糖蛋白在房室之间的转运未展示。

高尔基堆每一边都被管网围着。**高尔基体顺面网状结构（*cis*-Golgi network，CGN）**在高尔基体的进入面，它接受来自内质网输出位点的蛋白质，它的功能是作为质量控制装置，允许回收驻留蛋白，这些蛋白质是从内质网逃逸的（见 4.7 从内质网逃逸的驻留蛋白被回收）。**高尔基体反面网状结构（*trans*-Golgi network，TGN）**位于出口面，它把

蛋白质分散到不同的目的地。在胰腺细胞的情况下，高尔基体反面网状结构中主要的蛋白质是分泌性蛋白，它掺入到浓缩泡中，浓缩泡成熟，产生酶原颗粒。此外，高尔基体反面网状结构将溶酶体酶蛋白拣出，转运到溶酶体（经由内体途径），使远离细胞质膜的蛋白质和连续分泌的蛋白质移动到细胞表面。在非调节型分泌的细胞中，仅存在溶酶体途径和质膜途径。

虽然高尔基体有特征性的顺面-反面极性，反映出运输的方向性，内质网却不是这样。新合成的蛋白质被指引到内质网的输出位点，即内质网上特定用于形成运输小泡的区段。在哺乳动物细胞中，这些内质网输出位点遍及粗面内质网，并不总是跟高尔基体相联系。在缺乏调节型分泌途径的细胞中，内质网的输出位点经常位于与高尔基体有相当大距离的地方。如图 4.9（见图版）所示，内质网遍布整个细胞质，100 多个输出位点随机地分布着。相反，高尔基体突出地靠近细胞核分布，因此携带着分泌性蛋白的小

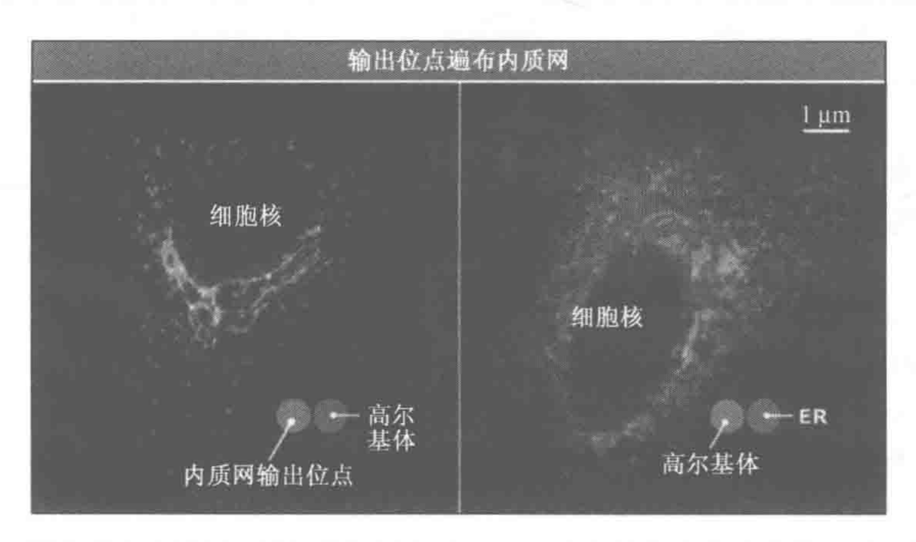


图 4.9　蛋白质在内质网、高尔基体及内质网输出位点的免疫荧光定位。图显示了两个不同的细胞。照片由 Yale 大学的 Laurence Pelletier 惠赠。

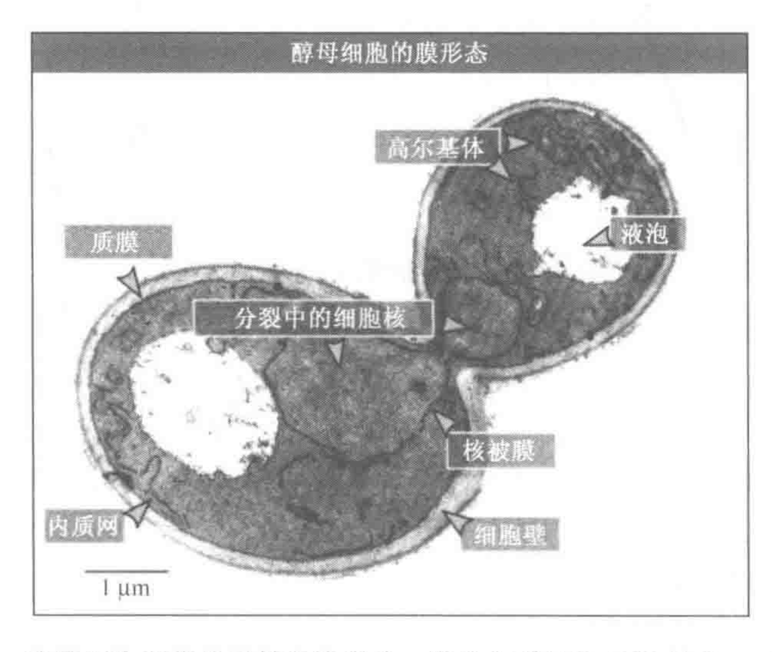


图 4.10　酵母细胞出芽的透射电镜照片。照片由慕尼黑 MPI 的 Francis Barr 惠赠。

泡必须穿越几微米（micron）的距离才能到达高尔基体。正如胰腺细胞是理想的细胞，用于显微镜和生物化学分级分离实验来确定分泌性蛋白穿越细胞所采取的路线，芽殖酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）已是很有用的遗传学系统，用来确定蛋白质运输所使用的大分子装置。如图 4.10 所示，芽殖酵母有定编的胞吐细胞器，其功能与哺乳类细胞相似。但是它们的组织形式有某些区别。它的内质网相当稀疏，大多数在质膜底下和围绕细胞核排列。这里没有明显的内质网输出位点，取而代之的是，运输小泡显示出能够从沿内质网的任何地方形成。高尔基体的存在形式多数是未堆叠的扁囊（小池），无明显的密集于核周现象。酵母没有明显的分泌颗粒，调节型分泌亦少见。尽管有这些差别，酵母用于运输的主要的蛋白质装置还是跟哺乳类细胞里见到的雷同，它在真核细胞中是保守的。

4.3 胞吞途径概述

关键概念

- 细胞外物质通过几种不同的机制被吸收进细胞。
- 内体和溶酶体中的低 pH 和降解酶对加工某些胞吞物质是重要的。

胞吞（endocytosis）是真核细胞通过在质膜处形成囊泡（vesicle）从细胞外环境吸收物质的过程。在很多方面与胞吐相反，胞吞具有它独自的功能：

- 营养物质的内在化。
- 调节蛋白质在细胞表面的表达，如激素受体、葡萄糖转运，使细胞能控制对配体的吸收。
- 细胞外碎片的吸收和消化。
- 重新召回在分泌期间插入质膜的膜。

此外，病原体，包括细菌、原生动物和病毒，利用胞吞过程来进入细胞。

在质膜处形成的囊泡在胞吞途径中与细胞器融合，如图 4.11 所示。这些细胞器的两个重要特点是内腔呈酸性和含有蛋白水解酶及其他降解酶，酸性 pH 最适合这些酶的功能。这些细胞器在一起形成一个降解酶的酸度和浓度连续统一体。可以粗略地把它们分为**早内体（early endosome）**、**晚内体（late endosome）**和**溶酶体（lysosome）**，其降解能力依次由最少到最多。溶酶体是一个降解酶的储藏所，这些酶在一起实际上能降解经内体投入溶酶体的任何生物学上的聚合物（蛋白质、脂类、碳水化合物、RNA、DNA）。虽然长期以来溶酶体被认为是胞吞途径上最终端的细胞器，但仍然有证据指出，有时候溶酶体会跟质膜融合。

一种 ATP 驱动的质子泵称作液泡 ATP 酶（v-ATPase），能将 H^+ 由胞质溶胶转移到胞吞细胞器的内腔，这样它们内部的 pH 就比胞质溶胶相对降低，后者的 pH 为 7.4。早内体的内部 pH 稍微偏酸（6.5～6.8），而晚内体和溶酶体内部的 pH 能低到 4.5。在各种内体隔室中，很多因素对调节 pH 起作用，包括 v-ATPase 自身的浓度、活性，还有离子的导电性质以及不同的内体膜上其他离子转运 ATPase 的特性。重要的是，每个隔室的 pH 都是针对它的功能精细定制的（见 4.15 某些受体从早内体进入再循环，而

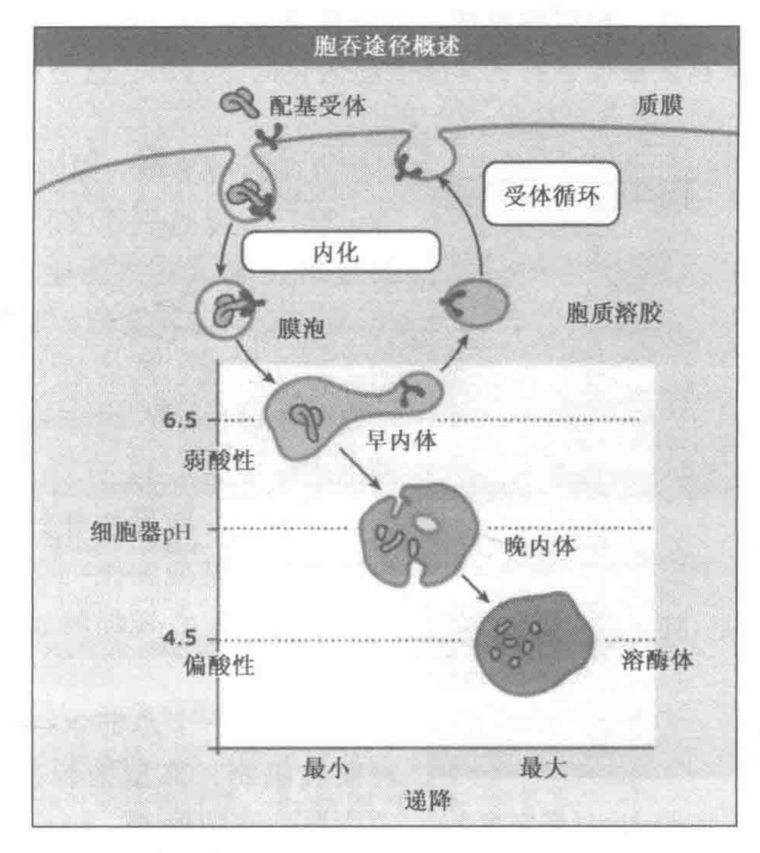


图 4.11 胞吞途径的细胞器构成酸性梯度，并具有降解能力。被胞吞的大分子再循环到质膜或被降解。

其他受体在溶酶体中被降解）（v-ATPase 的细节见 2.21 H^+-ATPase 把质子转运出细胞质）。

一直以来胞吞被分为吞噬（phagocytosis，“cell eating”）和胞饮（pinocytosis，“cell drinking”）两类，反映被内化的物质之大小尺度，如图 4.12 所示。专门的吞噬细胞（phagocyte），如巨噬细胞（macrophage），能吞食直径约 10μm 的物质进入运输小

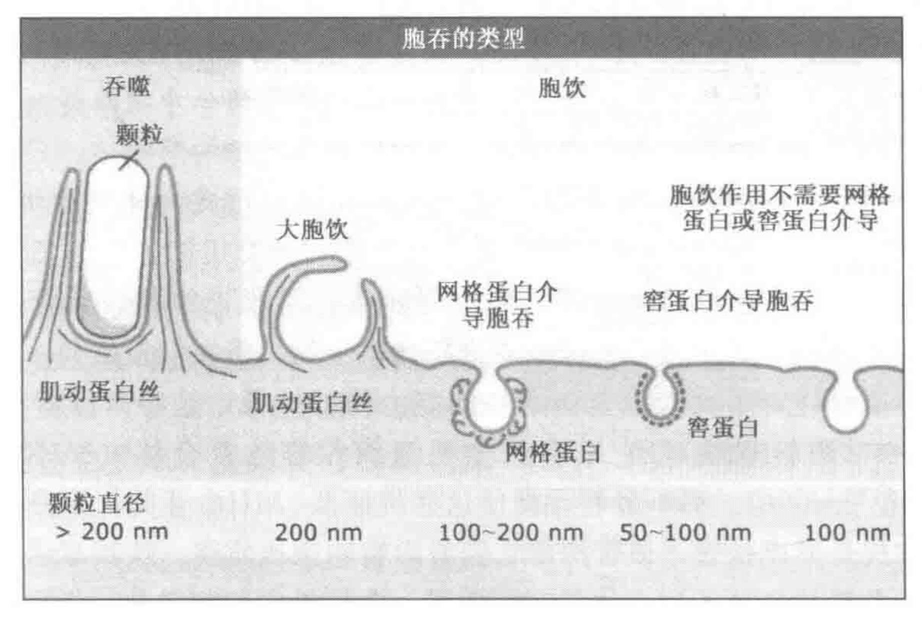


图 4.12 胞吞的几种机制。转引自 Conner，S. D.，and S. L. Schmid. *Nature*. 2003. 422：34-44。

泡。认为这一过程与“吃”相似的说法，进一步被吞噬体（phagosome）的内环境状况所支持，该内环境呈高度酸性，有利于降解已内化的蛋白质、脂类和碳水化合物的酶的活性。

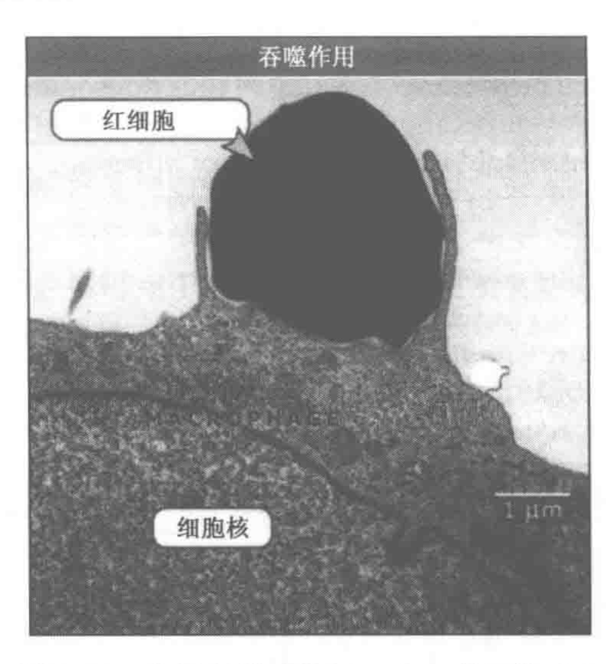


图 4.13 电子显微镜显示一个巨噬细胞正在吞食红细胞。照片由 Ohio 州立大学的 John M. Robinson 惠赠。

几乎所有类型的细胞都能介导吞噬作用，但是这一吞噬过程通常只与免疫系统的特定细胞相关联，例如巨噬细胞和树突状细胞（dendritic cell），它们吞噬病原体来帮助介导宿主防疫机制。甚至在没有感染的情况下，巨噬细胞也通过吞噬参与清除衰老的或凋亡的细胞，如图 4.13 所示。因为专门的巨噬细胞表达特异的激发吞噬的受体，在吸收极少量物质时比其他细胞更有效。例如巨噬细胞和其他的一些吞噬细胞表达针对抗体分子的受体。

胞饮是一个总的术语，它涵盖了不止一种吸收机制，典型地包括直径 0.1～0.3μm 的内吞小泡的形成。研究得最好的胞饮类型是**受体介导的胞吞（receptor-mediated endocytosis）**。早期对低密度脂蛋白（LDL）通过 LDL 受体被吸收的研究提供了大量的概念框架来理解胞吞途径（见EXP：4-0001）。在细胞表面，各种各样的受体结合着配体，如营养物、生长因子、激素、抗体或抗原等。受体-配体复合物通过积聚在质膜上被称做有被小窝（coated pit）的特定区域而被内化（见 4.13 胞吞过程通常由网格蛋白-有被小泡介导）。有的小窝被“掐”下来形成囊泡，并与早内体融合，这里的酸性使得某些配体与它们的受体分离，受体返回细胞表面，配体被送到晚内体，最终到达溶酶体。有的受体-配体复合物并不在早内体中分离，而是像已经释放的配体那样运动到溶酶体（见 4.15 某些受体从早内体进入再循环，而其他受体在溶酶体中被降解）。

在基本的胞吞途径中也会有一些变化。某些细胞有特殊的溶酶体，只负责内吞物质的部分降解，这是对内吞的病原体作出免疫应答的基本形式。树突状细胞（dentritic cell）就是一例，它是白细胞，见于血液循环及个体的所有组织。它们负责启动几乎所有的免疫应答，是由于它们具有独特的能力刺激 B 、T 淋巴细胞，后者识别并介导杀死病原体。树突状细胞捕获循环的抗原或进犯的微生物，将它们投放到一种特化的溶酶体隔室，这种溶酶体对于大批量蛋白水解的能力格外地低，这些条件有利于产生短肽（长度为 10～15 个氨基酸），它结合到主要组织相容性复合体（MHC）-Ⅱ类抗原（MHC class Ⅱ protein）。另一种特化能使这些抗原肽-MHC-Ⅱ类抗原分子复合体从溶酶体逃逸，方法是形成长管，该管携带它们的内容物到达质膜。这被显示在图 4.14 中。抗原肽-MHC-Ⅱ类抗原分子复合体移动到质膜，在那里它们刺激效应细胞。

胞吞途径的另一个变种是完全避开溶酶体。有一个过程称作**越胞作用（transcytosis）**。这个过程发生在上皮细胞，这些特化的细胞沿所有的体腔排列，如肠道的内表

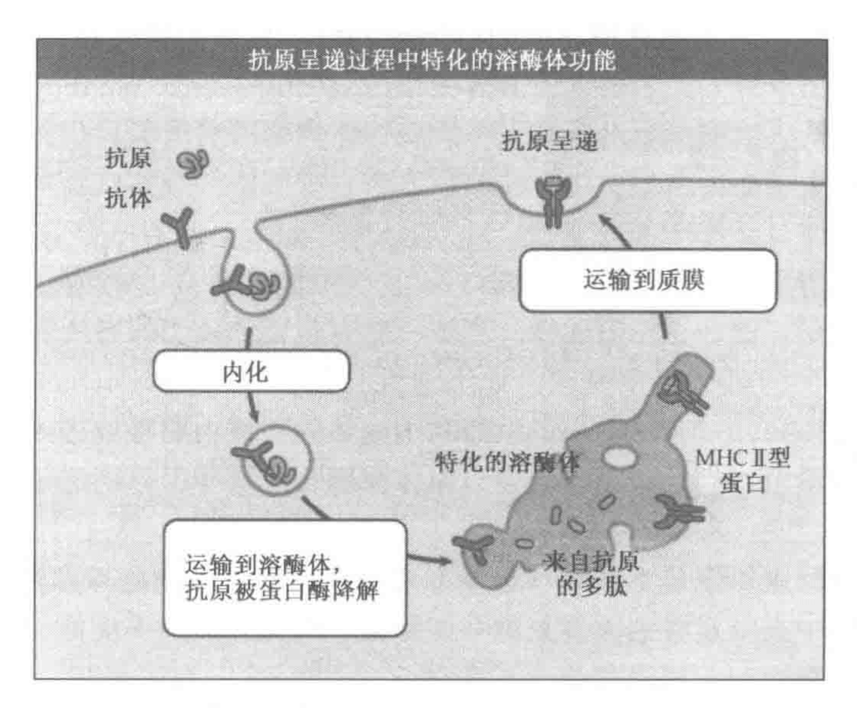


图 4.14　在免疫系统的细胞中，特化的溶酶体将胞吞的蛋白抗原降解成多肽，该多肽与 MHC Ⅱ型分子结合。多肽-MHC Ⅱ型复合物被转运到质膜，呈递给效应细胞。

面。上皮细胞的功能是管理身体与外界之间的物质转运。上皮细胞挨个排列形成连续的细胞层。上皮细胞是有极性的，有**顶端面**(**apical surface**)，面向肠腔和**基底面**（**basal surface**)，面向血液。越胞作用总体上是从形成网格蛋白-有被小泡开始，既可在顶端也可在基底外侧部的膜上形成。这种小泡跟内体融合，结果生成越胞小泡（transcytotic vesicle)，它是一类再循环小泡，被定向运送到细胞的对面与质膜融合。

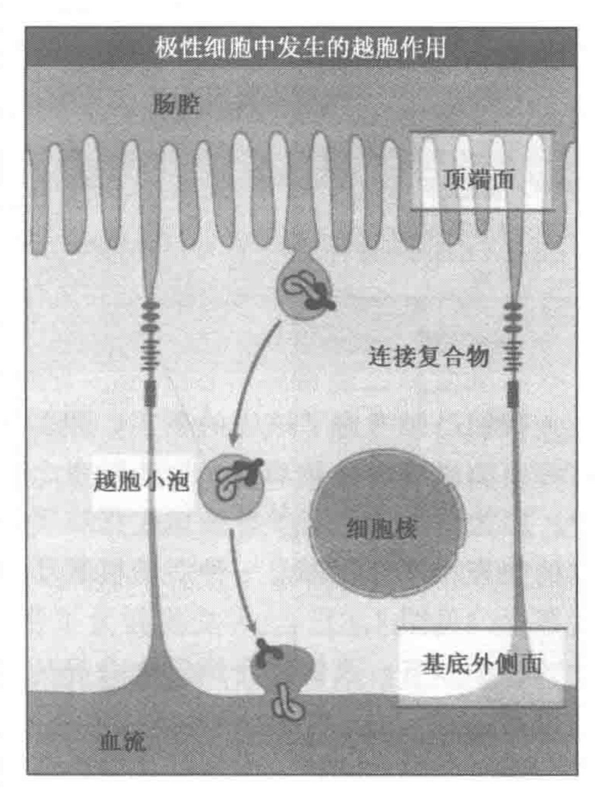


图 4.15　极性细胞中，胞吞的物质在跨越细胞质时，从膜的一个区域穿越细胞被运送到不同的膜区域出胞。

图 4.15 说明在肠道吸收营养物期间，一些胞吞时由细胞顶端面形成的转运小泡直接运动到基底面，然后释放内部的成分而不冒在溶酶体中被消化的危险。另一个越胞作用的例子是体液免疫从母亲到新生婴儿的传递。母乳中的免疫球蛋白在婴儿的肠道中通过细胞顶端面的受体被摄取，受体将它们释放到上皮细胞的另一边进入血液。

除了经由有被小窝吸收之外，其他类型的胞吞泡也能在质膜上形成（见图 4.12)。胞膜窖（caveolae）是小的凹坑，上面覆盖着窖蛋白（caveolin)。胞膜窖似乎是积累受体和膜脂的选择性亚群，这些物质并不在有被小窝中积累。当胞膜窖“掐”下来形成囊泡时，这些受体和膜脂被内化进入细胞。更

大更不均一的结构名为大胞饮体（macropinosome），也在质膜处形成，特别是在对一定的生长因子作出反应时。大胞饮体是大液泡（vacuole），大小跟吞噬泡差不多，能形成装载胞外液体的大液滴。通过胞膜窖和大胞饮体内化的物质能到达同样的内体和溶酶体。与物质经由有被小窝内化一样，经胞膜窖进入细胞的某些物质转瞬间就能被封闭在一种叫做胞膜窖体（caveosome）的专门的内体中。最后，还有一些物质是经小胞饮泡进入细胞的，它的形成缺乏已知的包被。

饶有兴趣的是，胞吞途径的酸性一直被一些有包膜的动物病毒所利用，这些病毒需要得到进入细胞质的机会以便复制。如水泡性口腔炎病毒（vesicular tomatitis virus）和无名森林病毒（semliki forest virus）靠利用内体的酸性内腔得以进入细胞。内体酸化了病毒表面的糖蛋白，启动病毒外包膜与内体膜融合。这样引导病毒基因组进入细胞质开始感染过程。

芽殖酵母进行胞饮但是不吞噬，这并不奇怪，因为酵母细胞被薄薄的细胞壁包围。形态学上在酵母中很难观察到大多数胞吞细胞器，因为它们的丰度低。不过，酵母的液泡总是能用电镜观察到，液泡相当于溶酶体（见图 4.1）。直到最近，当酵母中的胞吞现象的遗传学研究对于理解降解过程中泛素化所起的作用变得格外重要时，胞吞现象的遗传学研究已经滞后于胞吐研究（见 4.16 早内体成熟为晚内体和溶酶体）。

4.4 膜泡介导的蛋白质运输的概念

关键概念

- 运输小泡运送蛋白质和其他大分子，沿着胞吐和胞吞途径从一个膜围成的隔室到下一站。
- 由质膜上的蛋白复合物形成的包被帮助生成运输小泡，并选择那些需要被转运的蛋白质。
- 预定要转运到某一个隔室的蛋白质从驻留蛋白和将要到其他隔室的蛋白质中分选出来。
- 运输小泡利用系链和 SNARE 停泊，特异性地与路径上的下一个隔室融合。
- 携带着再循环的或被回收的蛋白质的运输小泡逆行（backward）运动，对小泡的前行（forward）运动做补偿。

我们已经考虑了这样的事实，即真核细胞含有由膜构成的隔室，每一个隔室都有自己特定的组成成分和功能。这些隔室之间频繁地交换组成部分，尤其在胞吞和胞吐过程中。因为蛋白质和脂类普遍地在脂双层中作侧向自由扩散，在不同的膜系统之间任何方向的物理相互作用都是一种对随机运动的吸引。我们已经介绍了运输小泡介导交换的一些概念（见图 4.3），这种交换是为了使隔室保持它的成分，物质进入小泡必须是选择性的。在本节，我们将介绍膜泡介导的运输（vesicle-mediated protein transport）发生的机制。

膜泡介导的运输可以被分成多个独立的步骤，如图 4.16 所示，这些步骤包括待运物质（cargo）的选择、膜泡出芽、切断（scission）、去包被（uncoating）、束缚（tethering）、停泊（docking）、融合（fusion）和融合蛋白的回收。

待运输的蛋白质首先必须被选择出来，膜蛋白例如受体，它有独特的分选信号在它的朝向胞质的末端。可溶性蛋白既被恰当的受体选择，也通过大量液流直接扩散到正在形成的膜泡中（见 4.5 信号介导的蛋白质运输和批量蛋白质运输概念）。为以后的步骤所需的蛋白装置（protein machinery）也被选择来用于转运。一些驻留蛋白、膜和可溶

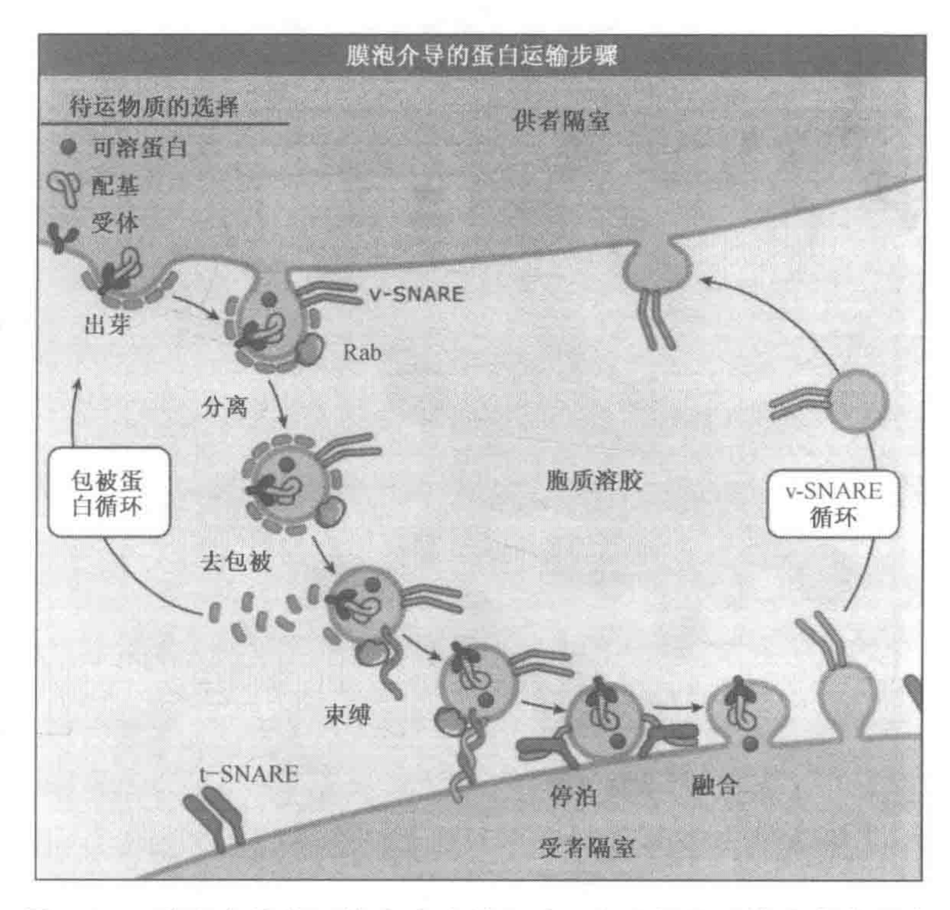


图 4.16 膜泡介导的运输由多步骤组成，它选择性地接收荷载蛋白（cargo protein）进入运输小泡，运输小泡选择性地与靶膜融合。

性蛋白含有特殊的序列限定它们到特定的房室，并防止它们被选上或扩散到正在形成的运输小泡中。

待运物质的选择发生于胞质中的**包被蛋白（coat protein）**与分选信号结合之时。包被蛋白既直接与信号相结合，也间接地经由接头蛋白复合物（adaptor complex）去结合。该复合物将待运蛋白连接到包被复合物（coat complex），包被蛋白决定运输小泡的类型。不同的包被蛋白用于不同的途径。例如如图 4.17 所示，COPⅠ和 COPⅡ包被用在胞吐途径，网格蛋白-有被小泡是膜泡的一种类型，用在胞吞途径。介导隔室间转运的膜泡的成分，反映了选择性转运的潜在机制。不仅是运载的物质不同，选择运载物质所涉及的蛋白质装置、出芽小泡的切断、膜泡的停泊和融合，都随供者隔室和靶隔室的不同而有所区别（见 4.6 COPⅡ-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输；4.8 COPⅠ-有被小泡介导从高尔基体到内质网的逆行转运和 4.13 胞吞过程通常由网格蛋白-有被小泡介导）。

要形成一个膜泡，首先细胞器的膜必须变形长出一个“芽体”，如图 4.16 所示。包被和接头复合物协助这一过程，也许与磷酸肌醇脂（phosphoinositol lipid）联合相助。出芽之后，“切断”蛋白（scission protein）帮助释放含有所选物质的有被小泡。切断事件需要膜融合来从供者隔室脱离产生一个膜泡。使膜变形和切断的机制大部分尚不知道，但是有关网格蛋白-有被小泡的形成和“切断”，却知道得比其他类型有被小泡多。

膜泡形成之后包被蛋白被移除［通过一个称为“去包被”（uncoating）的过程］，并在以后的膜泡出芽时被重新利用，去包被似乎对膜泡与靶膜相互作用是必要的。

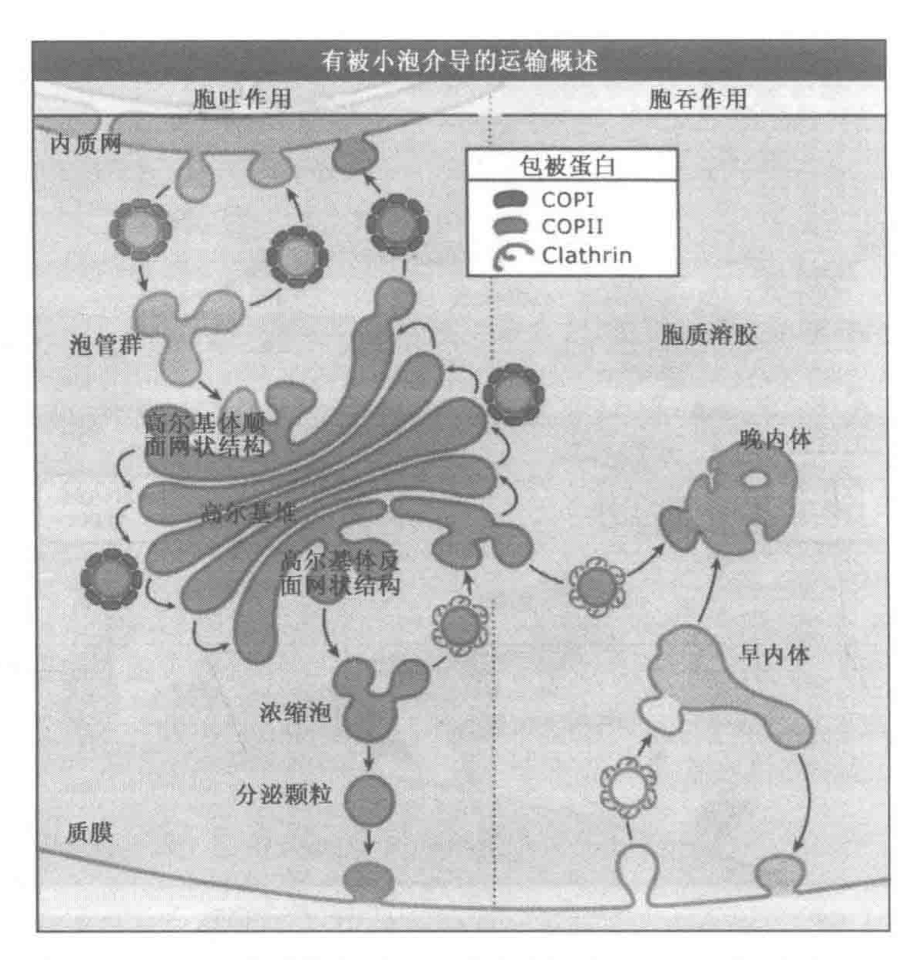


图 4.17 有三种类型的包被参与膜泡介导的运输，它们是 COPⅠ、COPⅡ和网格蛋白包被。

运输小泡附着在靶膜上有两个步骤，第一步是束缚（tethering），第二步是停泊（docking）。束缚被认为是给膜泡提供了一个检验膜的机会，确定是不是正确的目的地。停泊是这样的过程，它使膜充分紧密地靠在一起以致融合。“系链”（tether）包括 Rab 家族的小 GTP 酶和束缚蛋白（tethering protein），它是蛋白复合物。Rab 和束缚复合物（tethering complex）对于运输小泡和靶细胞器双方都是特异性的，从而帮助确定膜泡的目的地（见 4.11 Rab GTP 酶和系链是两种控制膜泡靶向运输的蛋白）。

在束缚之后，SNARE 蛋白与它们在靶细胞器上的对应物（counterpart）形成复合物，这种相互作用使膜泡停泊，对引导膜融合起着根本性的作用，该融合对于膜泡完成它的任务——释放膜成分和内部可溶性分子到它的目的地，是必需的。唯有通过膜融合两种膜才能确实地合并，允许膜泡内容物进入接触。不同的 SNARE 结合介导胞吐和胞吞途径上每一步膜融合步骤。ATP 酶 NSF 和连接蛋白 SNAP 接下来解聚在膜融合期间形成的 SNARE 复合物。来自供者膜的 SNARE 随后掺入到正在出芽的运输小泡返回到膜上（见 4.12 SNARE 蛋白可能介导膜泡与靶膜的融合）。

膜泡介导的运输分子机制的阐明很大程度上归功于创新的检测和分析方法的发展，这些分析方法是设计来提供新的视角用于研究膜的交通运输的各个方面。生物化学分析，它重建了在细胞器之间的运输或融合，使得能够鉴定和纯化单个的蛋白质成分，这些成分是运输所要求的（例如 SNARE、NSF、SNAP）（见EXP：4-0002和EXP：4-0003）。酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）蛋白分泌缺陷株的分离证实了这些蛋白质的生理意义，使

我们发现了许多其他蛋白质。数据库搜索与定点诱变（site-derected mutagenesis）相结合确定了胞质区域的分选信号，这些信号指引蛋白质到特定的运输小泡。

4.5 信号介导的蛋白质运输和批量蛋白质运输概念

关键概念

- 可溶性蛋白，尤其是那些大量分泌的蛋白，通过胞吐途径可能不需要特殊的信号。
- 分选信号也许被限定在膜蛋白和胞吞受体上，特别是那些要定向到某些细胞内目的地如溶酶体的信号。
- 某些可溶性蛋白含有允许它们跟受体相互作用的信号，这些受体介导它们转运到溶酶体。

有两个学派在思考关于蛋白质沿胞吞和胞吐途径移动的机制。它们是信号介导的运输和**批量运输（bulk flow protein transport）**，如图 4.18 所示。在信号介导的运输中，每个待运蛋白质含有一个或更多的短序列特定地指向沿路径的每个目的地。这些“分选序列”（sorting sequence）也叫做分选信号（sorting signal），将指示一个蛋白质究竟是作为驻留成分留在给定的细胞器还是进入一个膜泡运动到下一个细胞器，在那里它可能停留或者离开等……如果每一步都要求一个不同的信号，那么每个蛋白质必须有许多序列来应对一系列运输步骤，它必然是蹒跚而行以到达它最终的目的地（例如胞吐途径中的质膜或胞吞途径中的溶酶体）。

对可溶性蛋白来说，在这样的途径中当它处在膜泡腔和隔室期间，面对的问题比膜蛋白所面对的更加严重。可溶性蛋白在空间位置上位于细胞外侧。为了它们的运输能整

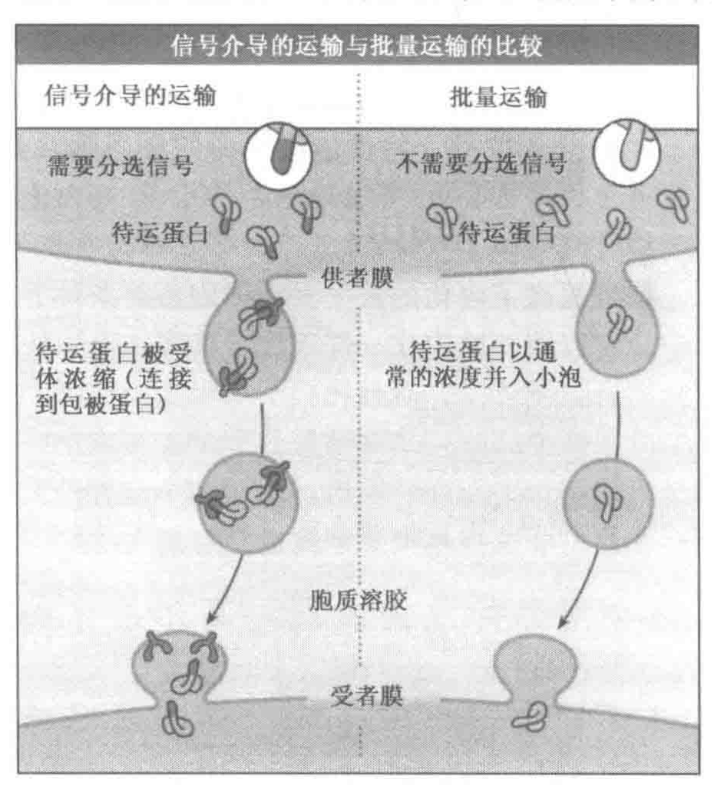


图 4.18　受体识别荷载分子（cargo molecule）上的分选信号并与之结合，荷载分子能通过受体集聚在出芽小泡中（信号介导的运输），也可以以通常的浓度进入小泡（bulk flow）。

个地被信号介导，必将设法使可溶性蛋白结合到膜受体上，受体转而又结合包被成分，包被成分选择性地积累待运物质到正在出芽的膜泡中。如果每一组可溶性蛋白每一步都需要一个不同的受体，可能需要几十或几百个受体提供给所有的蛋白质使它们在给定的时间内被转运。

其他学派考虑提供一种替换的机制，更展现了问题的复杂性。在批量运输模型（bulk flow model）中，“缺席途径”（default pathway）被定义为这样的旅程，即它不需要蛋白质具有分选信号来使其在膜性隔室之间运动。胞吐和胞吞途径将被认为是“缺席途径”。例如在胞吐途径中，被分泌的蛋白或膜蛋白将不需要分选信号来进入出芽膜泡，这两类蛋白质当它们在内质网腔中时，将以同样的浓度被送进一个从内质网出芽的膜泡。批量运输机制不涉及分选信号，分选信号是用来浓集出芽小泡中的蛋白质的。批量运输机制中，信号仅仅用于在胞吐途径内扣留一个隔室中的某个蛋白质（例如高尔基体中的保留）或转向另外的路径（例如转运到溶酶体）。

批量运输观点能解释细菌半乳糖苷酶（β-lactamase）导入爪蟾卵母细胞（*Xenopus* oocytes）后，能由内质网转运到细胞表面的现象。细菌没有与真核细胞相当的内膜，这意味着它们的蛋白质缺乏内质网输出信号。批量运输也有助于解释专门的分泌细胞如胰腺细胞的高速度输出。按批量运输的观点，蛋白质的分泌速度和被分泌的蛋白质种类已超过细胞为每一种蛋白质在每一个转运阶段提供受体的能力。

蛋白质运输采用信号介导和批量运输两种机制。批量运输模型最早用于描述胞吐途径的运输。信号对于许多从内质网转移出来，通过高尔基体隔室再到细胞表面的蛋白质并不是必需的，然而有证据说，一些离开内质网的膜蛋白和分泌性蛋白有输出信号或者采用辅助蛋白，它允许蛋白质被选择性地运送出来（见 4.6COPⅡ-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输）。

对于处于胞吞途径的蛋白质，有可靠的证据提示信号介导的运输对某些运输步骤而言是更为可取的机制。例如分选信号，它位于膜蛋白的质膜端，介导在质膜处的内化（细节见 4.13 胞吞过程通常由网格蛋白-有被小泡介导）。然而内化了的可溶性大分子从内体转移到溶酶体并不结合到受体上（见 4.16 早内体成熟为晚内体和溶酶体）。

当分子浓度低时，信号提高了内化的效率。在细胞培养条件下，小分子添加到非吞噬细胞周围的培养基中，它以液相被内化（即不固定到受体上）比它们结合到受体上的效率低。带着内化信号结合到受体上，通过将分子浓集到膜泡内，能提高连续吸收的效率达 100 倍。然而，当分子浓度高时，显著数量的分子能被内化，甚至在没有受体结合的情况下。这些看法也适用于由内质网的输出。当运输小泡直径大时，例如质膜上进行大胞饮时，可溶性待运物质的非选择性批量运输也是有意义的，

4.6 COPⅡ-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输

关键概念

- COPⅡ小泡是唯一已知的一群运输小泡，起源于内质网。
- 在内质网的输出位点 COPⅡ包被蛋白的装配需要 GTP 酶和结构蛋白。
- 在内质网中，膜蛋白输出信号通常在面向胞质一端。
- 从内质网脱离之后，COPⅡ小泡可以聚集、融合，然后沿着微管束移动到高尔基体的顺面。

内质网专营分泌性蛋白和其他蛋白的合成与恰当折叠，这些蛋白质是注定要到胞吐和胞吞途径上的隔室去的。从内质网输出仅发生在蛋白质折叠完成之时，在多亚基蛋白复合体情况下，仅在它们充分装配好时（见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。待输出的蛋白质集聚在内质网的输出位点上，位点负责运输小泡的组装，这些小泡将携带新合成的蛋白质到高尔基体（见图 4.9）。在分泌细胞中，传统上内质网输出位点被定义为大量膜泡出芽的位点，称为“转移元件”（transitional element）。

运输小泡被称作 COPⅡ（COP＝coat protein）小泡，它们提供了以膜泡方式从内质网出来的唯一路线。COPⅡ组分提供了使膜变形成为一个芽泡的手段，也可以特异地跟某些跨膜的待运蛋白（cargo）相互作用，选择它们以使其输出。这种 COPⅡ小泡形成的规则也应用到细胞中其他有被小泡（见 4.4 膜泡介导的蛋白质运输的概念）。

COPⅡ小泡出芽过程在图 4.19 中做了说明。有序地补充来自胞质的一系列组件启动了小泡的形成，它们是：可溶性 COPⅡ成分、Sar1p、Sec23/Sec24、Sec13/31。Sar1p 是一种小 GTP 酶（small GTPase），以它的无活性 GDP 结合形式存在于胞质溶胶中。Sar1p 通过与鸟嘌呤核苷酸交换因子 Sec12p（也称做 Sar-GEF）相互作用结合到膜上，Sec12p 是一个内源膜蛋白，它通过将 GDP 交换成 GTP 活化 Sar1p。

Sar1p-GTP 结合到膜上激发两个参与结构的包被复合物，Sec23/Sec24 和 Sec13/31 异二聚体相继地补充上来。Sar1p-GTP-Sec23/Sec24 复合物的晶体结构呈蝴蝶结状，它

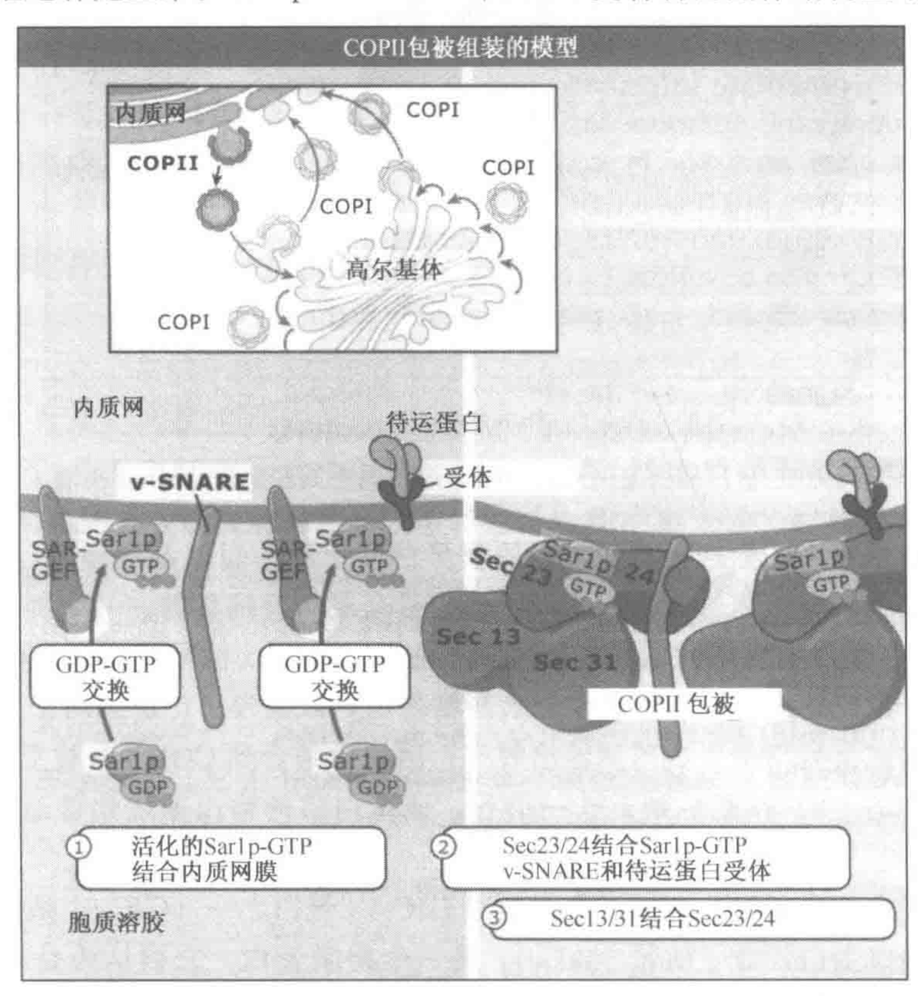


图 4.19　一个模型，显示 COPⅡ小泡形成时，包被蛋白和荷载分子（v-SNARE 和荷载物的受体）依次补入。

将会平顺地与COPⅡ小泡的弯曲表面相契合。这些复合物与Sec13/31聚合，可能有助于解释小泡的变形和出芽。Sec24结合待运物质，掺入到COPⅡ小泡中，这里有众多交叠的结合位点，有助于解释大量不同的待运物质分子的掺入。Sec23直接结合到Sar1p，刺激在小泡形成期间或形成之后已结合上的GTP发生水解。因此，Sec23是作为一个GTPase活化蛋白（GAP）起作用，使小泡去包被和释放包被亚单位用于进一步的出芽循环。

如图4.20所示，大多数待运蛋白掺入到出芽的COPⅡ小泡，既是通过批量运输也可用分选信号。批量运输机制似乎更多地用于可溶性分泌蛋白，它是在专门的分泌细胞中合成的（见4.5信号介导的蛋白质运输和批量蛋白质运输概念和4.19某些细胞储存蛋白质用于分泌）。

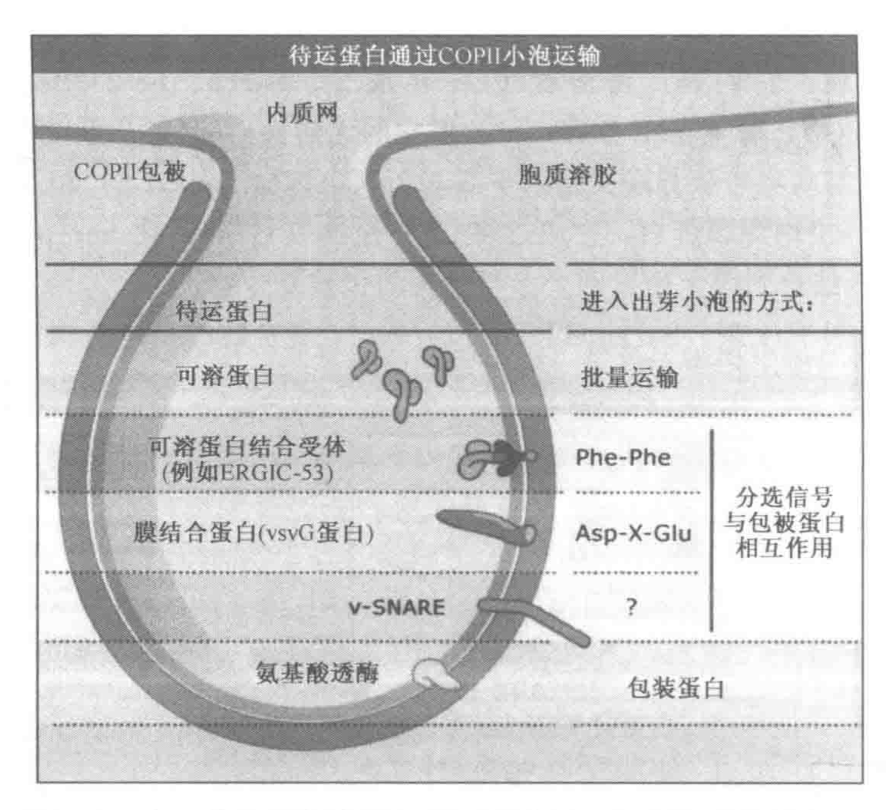


图4.20 被运输的蛋白质通过不同的机制进入新生的COP Ⅱ小泡。

内质网输出所用的分选信号通常是质膜蛋白胞质端的短氨基酸序列，如图4.21所示。在所有已知的分选信号中，内质网输出信号是最少特征性的。一个例子是在某些蛋白质如VSV G蛋白上发现的二酸式信号（diacidic signal，信号含有两个酸性氨基酸残基），VSV G蛋白是水泡性口腔炎病毒表面糖蛋白，该病毒已广泛地用于研究质膜生物发生学。二酸式信号增加了内质网输出效率，因为它结合到COPⅡ包被复合物的Sec24成分上。变异的VSV G蛋白缺乏这一信号，该蛋白质的输出速度比普通VSV G蛋白慢2～3倍。

内质网输出信号的另一个例子是内质网GIC-53蛋白之一（GIC-53是内质网、高尔基体、中间隔室蛋白，分子质量53kDa），是一个跨膜蛋白，它被认为是运送可溶性蛋白从内质网到高尔基体。它的胞质端含有一个双苯丙氨酸（diphenylalanine）信号，跟COPⅡ复合体的Sec23/Sec24成分相互作用。这个信号对内质网GIC-53蛋白离开内质

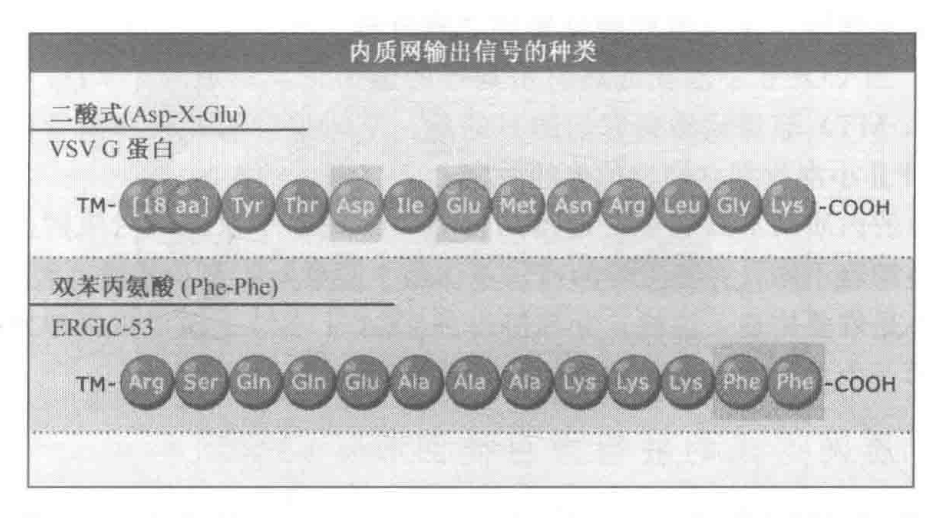


图 4.21　内质网输出信号有两种，分别含有两个酸性氨基酸残基（二酸式信号）或两个碱性氨基酸残基（二碱式信号）。

网是必不可少的。

可溶性待运蛋白也能这样使用输出信号，即间接地结合到受体上，受体并入到 COPⅡ小泡中（见图 4.19）。内质网 GIC-53 运送的从内质网到高尔基体的可溶性蛋白就含有这样一个信号。内质网 GIC-53 的管腔区域经由高甘露糖寡糖链（high mannose）结合到可溶性蛋白上，高甘露糖寡糖链出现在大多数正在离开内质网的糖蛋白上。然而，因为内质网 GIC-53 并不结合所有带有高甘露糖寡糖链的蛋白质，这个信号还必须有其他的成分。人类内质网 GIC-53 缺陷病人有不寻常的流血症状，因为血液中凝血因子Ⅴ和Ⅷ水平降低。内质网 GIC-53 有一批有限的成员进行蛋白质转运，也有其他蛋白质为它的缺席做补充。

有关可溶性蛋白依赖信号从内质网输出的另一个例子是 α-因子（α-factor）糖蛋白，它由芽殖酵母（*S. cerevisiae*）作为交配过程的一部分被分泌出来。一个跨膜蛋白受体最近已被鉴定出来，它将 α-因子浓集在 COPⅡ小泡中。

促待运蛋白掺入出芽的 COPⅡ小泡的另一条途径是使用包装蛋白（packing protein），包装蛋白并不自行在小泡中告终。例如，酵母的质膜上有氨基酸透酶（amino acid permease）。新合成的透酶沿着胞吐途径被运送到细胞表面。这些透酶在内质网掺入 COPⅡ小泡涉及一种包装蛋白（Shr3p），虽然其机制尚未知。与二酸式信号（diacidic signal）相同，包装蛋白表现出有增加内质网输出效率的功能，但对于内质网输出并不是绝对必需的。

转运装置的组成成分，如 SNARE 蛋白，它介导运输小泡在靶膜停泊并融合，它也必须掺入到运输小泡中（见 4.12 SNARE 蛋白可能介导膜泡与靶膜的融合）。SNARE 是膜内在蛋白，它们是怎样并入 COPⅡ小泡的呢？从内质网到高尔基体的转运涉及的两种 SNARE（Bet 1p 和 Bos 1p）结合到已经与膜结合的 Sar1p 和 Sec23/24 上。Sec13/31 被补充是在这些 SNARE 之后，这一事实表明当小泡出芽时 SNARE 掺入。有一种假说是：SNARE 可能在小泡出芽过程中起核心作用，这样保证在所有形成的 COPⅡ小泡中出现靶向信号。然而，没有直接的证据证明这一具有吸引力的可能性。

从内质网脱离之后，COPⅡ小泡移动到高尔基体并与之融合。COPⅡ小泡出现簇

集，也许在内质网输出位点彼此融合形成“泡管群”（vesicular tubular cluster，VTC）（见图 4.17）。当 COPⅡ小泡在远离高尔基体的输出位点形成时，VTC 可以沿着微管（microtubule，MT）轨道运动到它们的目的地。空间位置的并列和微管依赖性运输都可以提高 COPⅡ小泡找到它们目的地的效率。

芽殖酵母的内质网不具有独立的输出位点，COPⅡ小泡能从内质网的所有部位出芽。跟哺乳类细胞不同，芽殖酵母的高尔基体扁平膜囊分布遍及胞质，大多数是单独的扁平膜囊而不是堆叠构造。这样，芽殖酵母的 COPⅡ小泡运输可以简单地采取内质网出芽位点与第一个可用的扁平膜囊之间的最短距离。

4.7 从内质网逃逸的驻留蛋白被回收

关键概念

- 大量的内质网可溶性蛋白含有允许它们从晚期隔室回收的序列（如 KDEL 或相关序列，回收通过 KDEL 的受体进行。
- 驻留蛋白及循环蛋白通过面向胞质端的一种二碱式信号（dibasic signal）被回收到内质网。
- 内质网上Ⅰ型跨膜蛋白的回收信号是一个双赖氨酸（dilysine）信号，Ⅱ型跨膜蛋白有一个双精氨酸（diarginine）信号。

内质网腔内有高浓度蛋白质，估计＞40mg/ml。这些蛋白质包括新合成的分泌性蛋白，在更大程度上有驻留的内质网蛋白，特别是蛋白伴侣（chaperone），它帮助分泌性蛋白折叠成有功能的构象。由于产出了大量蛋白质以及至少某些蛋白质可能会以批量运输方式从内质网输出，细胞持续地处于将内质网功能蛋白排出细胞的风险之中。的确，这种情况确实发生了，结果是内质网驻留蛋白被分泌到细胞外环境中，但是即使发生过也很稀少。这是因为细胞有一种高效的“回收”（retrieval）机制，捕获从隔室中逃逸出来进一步进入胞吐途径的蛋白质，并将它们送回内质网。

最具特征性的回收机制涉及一个四肽（tetrapeptide）分选信号，它出现在内质网腔中大多数或所有可溶性蛋白的羧基端（C 端）。在哺乳类细胞中，**回收信号（retrieval signal）**序列为 Lys-Asp-Glu-Leu（KDEL），它最初被发现是作为蛋白伴侣（见 EXP：4-0004），这个信号的变种已在所有其他真核生物中发现。在芽殖酵母中内质网回收信号是 His-Asp-Glu-Leu（HDEL）。

如图 4.22 展示的，逃逸的蛋白被一个受体识别，该受体结合到回收信号上。在哺乳类细胞中，KDEL 受体多数在内质网后的（post-ER）VTC 和 CGN 隔室中被找到，但是在高尔基体的更远端的隔室中很少发现 KDEL 受体。KDEL 受体结合到蛋白质的 KDEL 序列引发蛋白质-受体复合物掺入一群称作 COPⅠ小泡的有被小泡中，COPⅠ小泡将该复合物转运回内质网中（见 4.8 COPⅠ-有被小泡介导从高尔基体到内质网的逆行运输）。在这里，回收的蛋白质脱离受体，这一过程可以由内质网腔中的高浓度钙离子激发，而不是在 VTC 和 CGN。体外实验显示脱离能被 pH 改变激发，但是不知道是否内质网与 CGN 的 pH 不同。空的 KDEL 受体在 COPⅡ小泡中离开内质网，转到 VTC 和 CGN 去继续它的回收之路。

内质网的驻留膜蛋白也能逃逸，它们也有回收信号，称作二碱式信号（dibasic signal，即含有两个碱性氨基酸残基）。驻留的内质网蛋白是Ⅰ型跨膜蛋白（N 端在腔中），

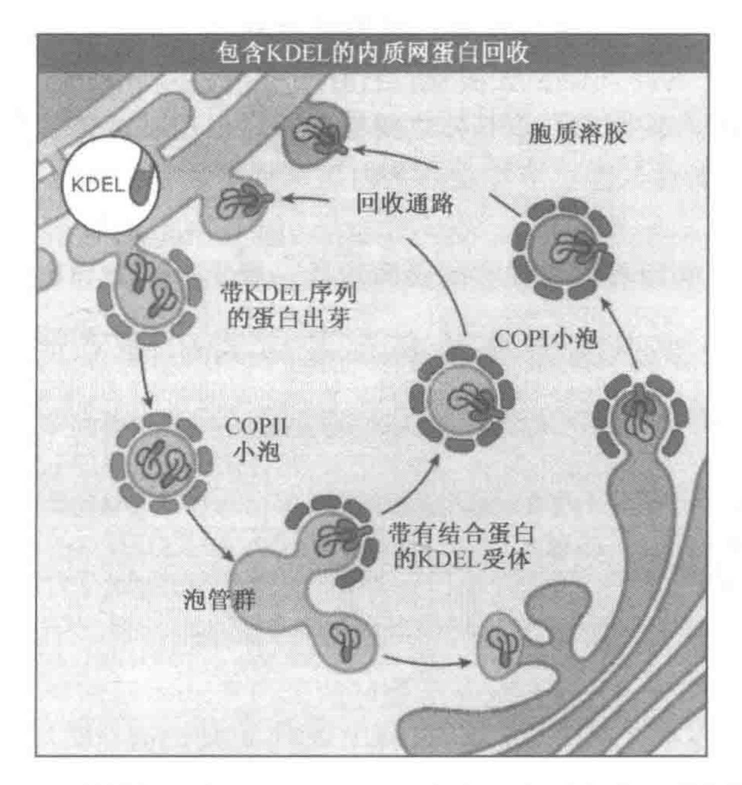


图 4.22 内质网腔中有高浓度蛋白质，偶尔蛋白质会逃逸到泡管群和高尔基体顺面房室。这些蛋白质含有 KDEL 序列，能被该序列的受体识别，将蛋白质送回内质网。

有一个双赖氨酸信号（Lys-X-Lys-X-X，这里 X 是任意氨基酸）在蛋白质面向胞质端的末尾，如图 4.23 所示。双赖氨酸信号直接结合到 COPⅠ包被的 α 亚单位上（见 4.8

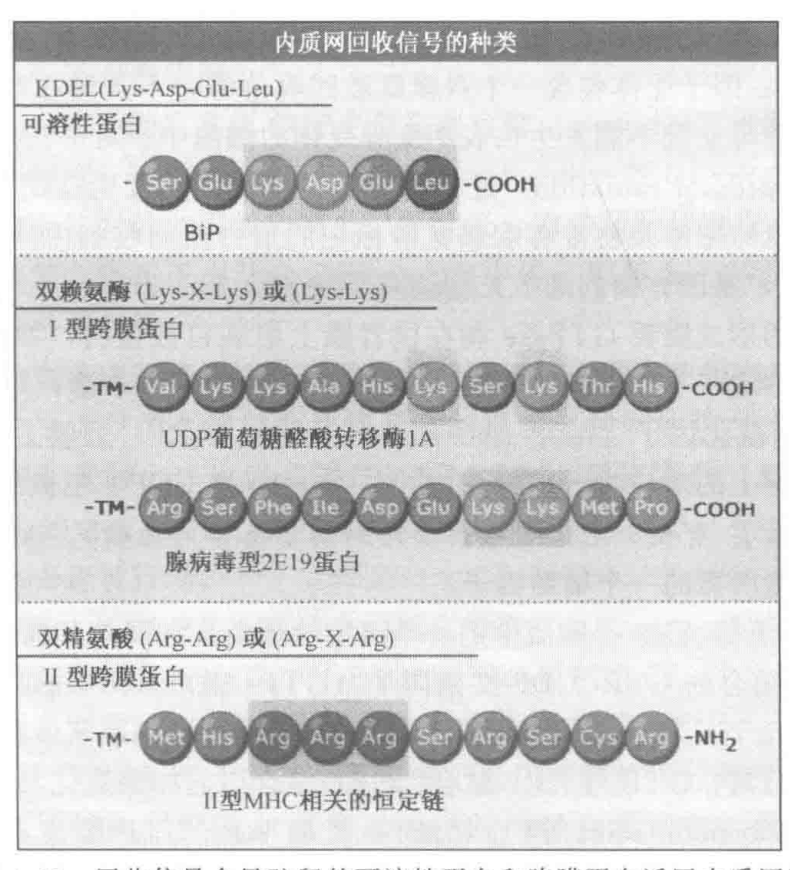


图 4.23 回收信号介导驻留的可溶性蛋白和跨膜蛋白返回内质网腔。

COPⅠ-有被小泡介导从高尔基体到内质网的逆行转运）。驻留的内质网Ⅱ型跨膜蛋白（C端在腔内）使用一种不同的回收信号，它有两个相邻的精氨酸。

平常往复循环于内质网和高尔基体之间的膜蛋白也用二碱式信号进行回收。一个例子是ERGIC-53，它转运某些可溶性蛋白从内质网到高尔基体（见4.6 COPⅡ-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输）。ERGIC-53同时有两个信号，一个是内质网输出信号，另一个是双赖氨酸回收信号在它的面向胞质一端，分别介导离开及返回内质网。

4.8 COPⅠ-有被小泡介导从高尔基体到内质网的逆行转运

关键概念

- COPⅠ包被的装配被一个称作ARF的膜结合GTP酶（GTPase）激发，它募集起包被蛋白复合物，包被蛋白复合物随着GTP水解而解离。
- COPⅠ 包被直接或间接地结合到待运蛋白上，将其从高尔基体运回内质网。

正如COPⅡ-有被小泡与新合成并折叠好的蛋白质从内质网向前运动到高尔基体有关，**COPⅠ-有被小泡（COPⅠ coated vesicle）**与从高尔基体到内质网的**逆行转运（retrograde transport）**有关（见图4.17）。COPⅠ小泡在回收从内质网逃逸的蛋白质方面起重要作用（见4.7从内质网逃逸的驻留蛋白被回收）。此外，它们使基本的膜泡成分再循环，如SNARE蛋白从高尔基体回到内质网以及从高尔基体反面到顺面。也有证据表明COPⅠ小泡参与了高尔基堆内部的前行转运（forward transport），虽然其明确的作用仍有争议（见4.9关于通过高尔基体的前行转运的两个模型）。

关于COPⅠ小泡在逆行转运中的作用，最好的证据来自酵母中的遗传学交配效验试验。要启动交配过程，交配因子α必须结合到它在质膜上的受体（见NBIO：4-0001）。α因子受体包含一个双赖氨酸回收信号，不是露在细胞表面，而是在面向胞质一端。酵母交配不能发生在表达变异受体的细胞中。对一些能恢复酵母交配的抑制物突变（suppressor mutation）进行了鉴定。这些突变发生在编码COPⅠ 包被成分的基因，这就意味着涉及将带有双赖氨酸标记的蛋白质回收到内质网的COPⅠ小泡（酵母抑制物突变，基因方面的细节见GNTC：4-0001）

COPⅠ小泡的形成需要GTPase和在供者膜上组装包被蛋白，如图4.24所示。组装过程与COPⅡ相似，但是使用不同的蛋白质。对于COPⅠ小泡，第一步是募集GTPase和ADP核糖基化因子（ADP-ribosylation factor，ARF）到膜上，对ARF的特征描述比它在内质网上的对应物Sar 1p的要少，Sar 1p在COPⅡ包被组装中起着相似的作用（见4.6 COPⅡ-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输）。ARF最早被认定为霍乱毒素杀死细胞所需的一个辅助因子。

结合到GDP上的ARF是胞质中的一个可溶性蛋白。如同与其他小GTPase结合时一样，ARF通过结合到GTP-GDP交换因子（GTP-GDP exchange factor，GEF）而被活化（GEF的细节见MBIO：4-0002）。ARF-GEF出现在高尔基体膜上，其作用是诱发GDP与ARF分离，GTP与ARF结合。GTP结合引起构象变化，暴露出ARF N端的脂肪酸残基（myristic acid，肉豆蔻酸），帮助ARF-GTP固定在高尔基体膜上。ARF-GEF是Brefeldin A的特异性靶物，Brefeldin A阻止COPⅠ小泡组装，引起高尔

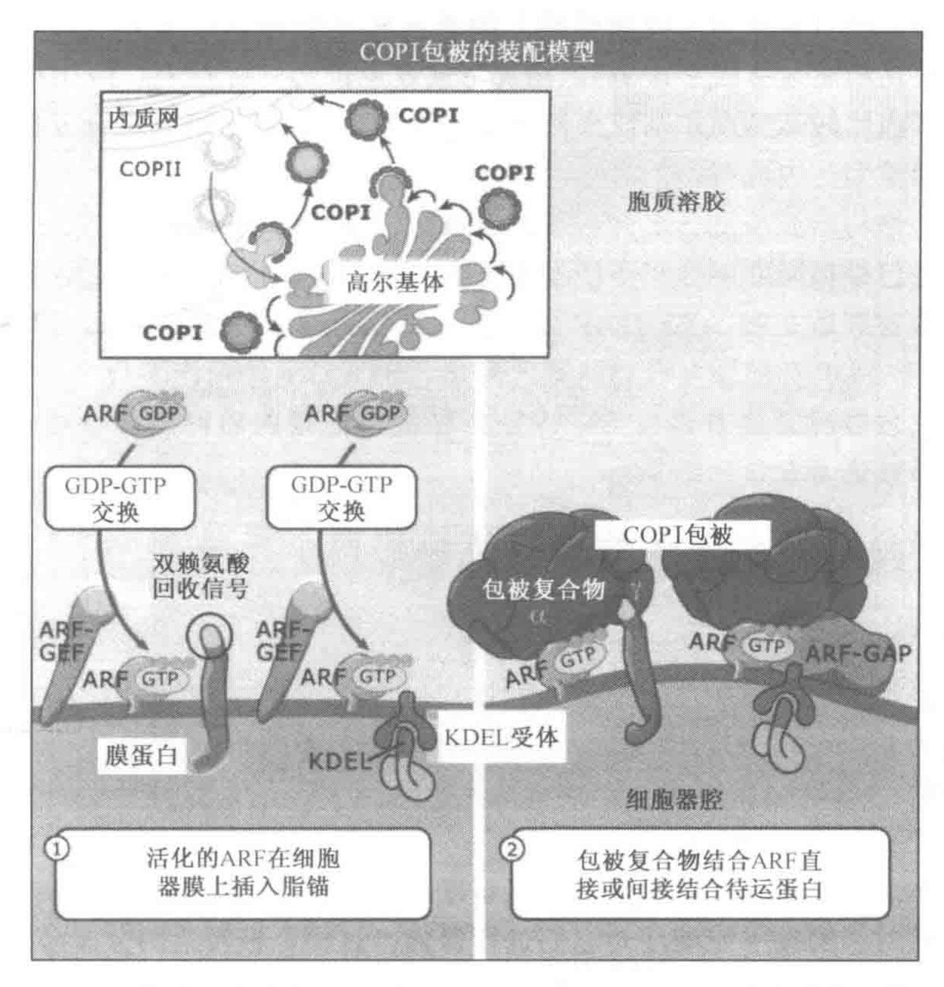


图 4.24　一个模型，显示在 COP Ⅰ小泡形成时包被蛋白和荷载分子依次补入，此例是荷载分子（Ⅰ型跨膜蛋白和 KDEL 受体）被回收到内质网。

基体膜大量地重分配进入内质网。

膜结合的 ARF-GTP 随后募集 **COP Ⅰ包被复合物（coatomer）**到膜上。每个包被复合物由 7 个蛋白质组成，被称作 α-、β-、β′-、γ-、δ-、ε-、和 ζ-COP。带负电荷的膜脂结合到包被复合物上使它可以添加到膜上。包被复合物的结合帮助在小泡出芽期间使膜变形。这样，包被复合物在正出芽的 COP Ⅰ小泡中的作用跟 Sec 23/24 和 Sec13/31 对 COP Ⅱ小泡的作用是相似的。

COP Ⅰ包被能直接或间接地结合到那些再循环回到内质网的蛋白质上。对于Ⅰ型蛋白，包被复合物的 γ-亚单位直接结合到胞质端的双赖氨酸回收信号上。COP Ⅰ包被也间接地结合到 KDEL 受体上，也许是通过 **ARF-GTPase 活化蛋白（ARF-GAP）**来返回那些从内质网逃逸的含有 KDEL 序列的可溶性蛋白。ARF-GAP 刺激 ARF 上的 GTP 水解，导致随后的去包被行动。

如图 4.22 所示，当 COP Ⅱ小泡融合形成泡管群（vesicular tubular cluster，VTC）时，回收蛋白的过程很快就开始了。COP Ⅱ小泡从内质网出芽，作为 VTC 继续沿着微管运动到高尔基顺面网状结构（CGN）（见 4.6 COP Ⅱ-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输）。回收从 CGN 处发生，在更低程度上也从高尔基体的更远部分发生。

使用一定的毒物探查了从高尔基体远端进行的蛋白质回收，例如使用霍乱毒素（cholera toxin），它是霍乱弧菌（*vibrio cholera*）的一种产物。霍乱毒素被胞吞，从内

质网进入胞质，极可能使用了内质网膜上的逆向转移机制（见 3.19 ER 中错误折叠的蛋白质最终被返回胞质溶胶中降解）。霍乱毒素亚单位之一有一个 C 端 KDEL 序列。被胞吞的毒素从内体转运到高尔基反面网状结构（TGN），在这里它结合末梢的 KDEL 受体，经逆行运输到达内质网。

COPⅠ小泡与内质网融合之前必须去包被，以便运输小泡能更紧密地靠近它的融合对象。如果去包被被阻断融合将不能发生。去包被的机制尚未充分阐明，但是据认为小泡的包被复合物离散是被 ARF-GAP 激发的。想法是 ARF-GAP 刺激 GTP 被 ARF 水解，结果 ARF-GDP 和包被复合物从膜上释出。KDEL 受体可能参与将 ARF-GAP 募集到小泡上。去包被后紧接着是由 SNARE 介导的小泡跟内质网融合（见 4.12 SNARE 蛋白可能介导膜泡与靶膜的融合）。

4.9 关于通过高尔基体的前行转运的两个模型

关键概念

- 随着膜囊成熟，大的蛋白结构通过高尔基体转运。
- 单独的蛋白质和小的蛋白结构通过高尔基体转运既经由反面的成熟过程，也经由小泡介导的运输。

高尔基体是一个多隔室细胞器，含有有序分布的酶，当糖蛋白和脂类从顺面膜囊向反面膜囊转移时，酶按一定顺序对它们进行修饰。这样，被转运的分子必须穿过构成这个细胞器的每一个隔室，但是对这一机制颇具疑议。有两个关于通过高尔基体的前行转运模型，**膜囊成熟（cisternal maturation）**和小泡介导的转运，主要是用不同大小的转运物质进行研究的结果。

膜囊成熟模型源于观察某些植物细胞，它们分泌鳞皮（scale）覆盖细胞表面。这些蛋白质鳞皮好像是在高尔基体中构建出来的，其大小与含有它们的膜囊相当（直径大约 1～2 μm）。整个膜囊的移动好像是唯一的途径使它里面的鳞皮能够穿过高尔基体移动。新的膜囊装配的鳞皮被认为是在高尔基体顺面（*cis* face）或称进入面（entry face）产生，成熟膜囊含有的鳞皮将从高尔基体反面（*trans* face）或称出口面（exit face）离开。

这些观察引发了关于膜囊成熟的观念，认为膜囊携带的鳞皮应该是通过高尔基体移动的，如图 4.25 所示。成熟不仅涉及膜囊物理位置的移动，还有膜囊膜的改造，以变换那些在鳞皮成熟上起作用的酶群，使其有序地由一批酶转换到下一批酶。膜囊成熟模型的试验遭遇障碍，因为植物材料在实验上难以处理。也不清楚所提出的鳞皮转运机制究竟是只限于那些有机体还是普遍适用。大多数细胞生物学家认为是前者，虽然现在有形态学证据指出，甚至在含有大量多聚体蛋白如胶原纤维的哺乳类细胞中也可以以十分相同的方式跨越高尔基体（见 15.3 胶原蛋白支撑着组织结构）。

小泡介导的运输模型源自用高尔基体膜做的观察 VSV G 蛋白前行转运体外重构实验（见EXP：4-0005）。实验证实，在高尔基体顺式与反式膜囊之间运输这样的条件下，COPⅠ小泡含有 VSV G 蛋白。特别是在催化 VSV G 蛋白末端糖基化的糖基转移酶遗传缺陷株细胞中，VSV G 蛋白被表达。来自这些细胞的高尔基体膜与来自野生型细胞

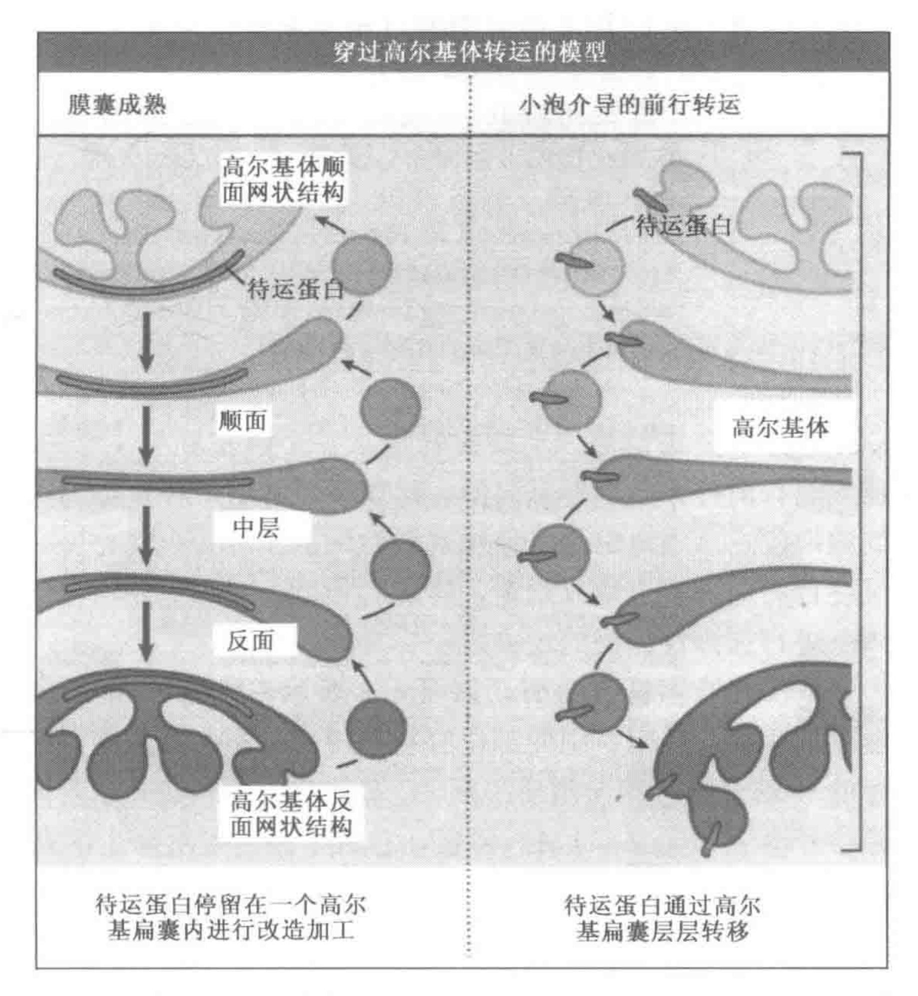


图 4.25　穿过高尔基体的运输的两个模型，它们是膜囊成熟模型和膜泡介导的运输模型。

的含有糖基转移酶的高尔基体膜在体外共孵育，观察到末端糖基化和 COPⅠ小泡似乎作为中介物介导高尔基体膜囊之间的运输。没有观察到高尔基体膜直接融合。这些实验产生了这样的想法，在图 4.25 中有说明，即高尔基体由带有转运物质的稳定的膜囊堆组成，这些物质在 COPⅠ小泡中从一个膜囊到下一个膜囊地向前运动。

如体外重构实验中得到的结果所示，膜泡运输机制要求 COPⅠ小泡介导分泌性物质跨越高尔基体向前运输的方向是从顺面到反面。然而，这样一个发现，即 COPⅠ小泡介导从高尔基体到内质网的逆行转运（见 4.8 COPⅠ-有被小泡介导从高尔基体到内质网的逆行转运）提示，在膜囊成熟模型中膜囊改造可以怎样进行。当 COPⅠ小泡跨越高尔基堆成熟为反面膜囊时，COPⅠ小泡能回收顺面膜囊的固有成分。确实，使用生物化学技术和免疫电镜，在 COPⅠ小泡内已经发现高尔基酶。当然，发现 COPⅠ小泡介导逆行转运并不排除它们可能的功能，即作为分泌物质携带者从顺面膜囊到反面膜囊前行。确实有证据表明 COPⅠ小泡含有新合成的转运物蛋白，如 VSV G 蛋白和前胰岛素（proinsulin），提示 COPⅠ小泡有不同的类群，它们有各自的工作范围。

简而言之，在膜泡介导的运输中，高尔基膜保持着自己的位置，物质在小泡中被转运。相反，在膜囊成熟模式中，物质保持原位（在一个膜囊内），膜囊的膜围绕着它进行改造。重要的是要认识到这两种模型不是互相排斥的，膜囊成熟和膜泡介导的运输二者同时都起作用。因太大而不能进入 COPⅠ小泡的物质，能够经膜泡成熟来移动穿过

高尔基体，留下更小的分子在COPⅠ小泡中通过高尔基堆。但这并不意味着膜囊成熟只移动大的构造，而是说它们是做这件工作的最好方法。

4.10 蛋白质在高尔基体中的保留依赖于其跨膜区域

关键概念

- 跨膜区域和与它邻接的序列对于将蛋白质保留在高尔基体中具有重要意义。
- 高尔基体蛋白保留机制依赖于形成寡聚复合物的能力和跨膜区域的长度。

先前我们已经考虑了分选信号，它安排物质从一个隔室到另一个隔室的选择性转运。在胞吐途径上既有前行方向也有反向的。然而，还有另一种重要的机制保障单个蛋白质在限定的细胞内位点恰当地定位，称作选择性保留。这一机制允许一个给定的蛋白质在通向它的最终目的地的某个地方锚定，防止它被批量运输或经信号依赖性事件转运出去。高尔基体是进行选择性保留的地方之一。

高尔基体内有许多修饰寡糖链的酶，如图4.8所示，修饰*N*-连接寡糖链。不同的酶显示出在膜囊堆的顺面、反面、中间部位有它独特的分布。高尔基体的酶普遍地是Ⅱ型跨膜蛋白，短的N端暴露在朝向胞质一面，C端催化结构域在高尔基体腔内。

跨膜区域是信号锚（signal anchor）装置，它最早启动指引新生的高尔基酶到内质网（见第3章蛋白质的膜定向转移）。跨膜区域侧面邻接的氨基酸保证酶在膜上正确的空间位置。跨膜区域和它侧面的氨基酸也在很大程度上负责酶在高尔基体中的保留。有一种报告蛋白（reporter protein），一般并不会集中到高尔基体，当酶被移植到报告蛋白上，酶的跨膜区域和它侧面的氨基酸序列足以把报告蛋白定位在高尔基体中。这些序列被认为是**保留信号（retention signal）**。

如图4.26所示，有两个模型已被提出来解释蛋白质如何被留在高尔基体，它们是同类识别（Kin recognition）模型和双层厚度（bilayer thickness）模型。同类识别模型认为同在一个膜囊的高尔基酶通过它们的跨膜区域彼此识别。在酶处于临界浓度时，这种识别能够造成太大的聚集以至难以进入COPⅠ小泡，由此保证酶既不向前移动也不反向移行。在这个模型中，高尔基保留不是受体介导的（例如不像由KDEL受体介导的回收那样）（见4.7从内质网逃逸的驻留蛋白被回收）。如此一来，这个模型就预测了高尔基保留将不是可饱和的过程。

同类识别模型得到以下实验结果的支持：人为地约束在内质网中的高尔基酶能使那些通常与它占据同一个高尔基膜囊的酶重新定位。在这个实验中，一个高尔基酶被设计成在它的胞质端含有一段内质网回收信号，并能在细胞中过表达。这个酶的变异体被发现在内质网中与正常酶形成的复合体中。这样，这个变异酶就改变了正常酶从高尔基体到内质网的分布。

双层厚度模型的出发点是认为跨膜区域的长度而不是组成成分对于蛋白质保留在高尔基体中是重要的。模型基于这样的事实，即膜中胆固醇的量，从它在内质网膜中的合成位点到质膜沿着胞吐途径增加。因为在体外实验中胆固醇浓度增加导致脂双层厚度增加，因此可以期望从内质网到质膜存在一个脂双层厚度的梯度。高尔基酶比膜蛋白有较短的跨膜区域，所以在这个模型里，高尔基酶会沿着胞吐途径移动直到与脂双层的厚度

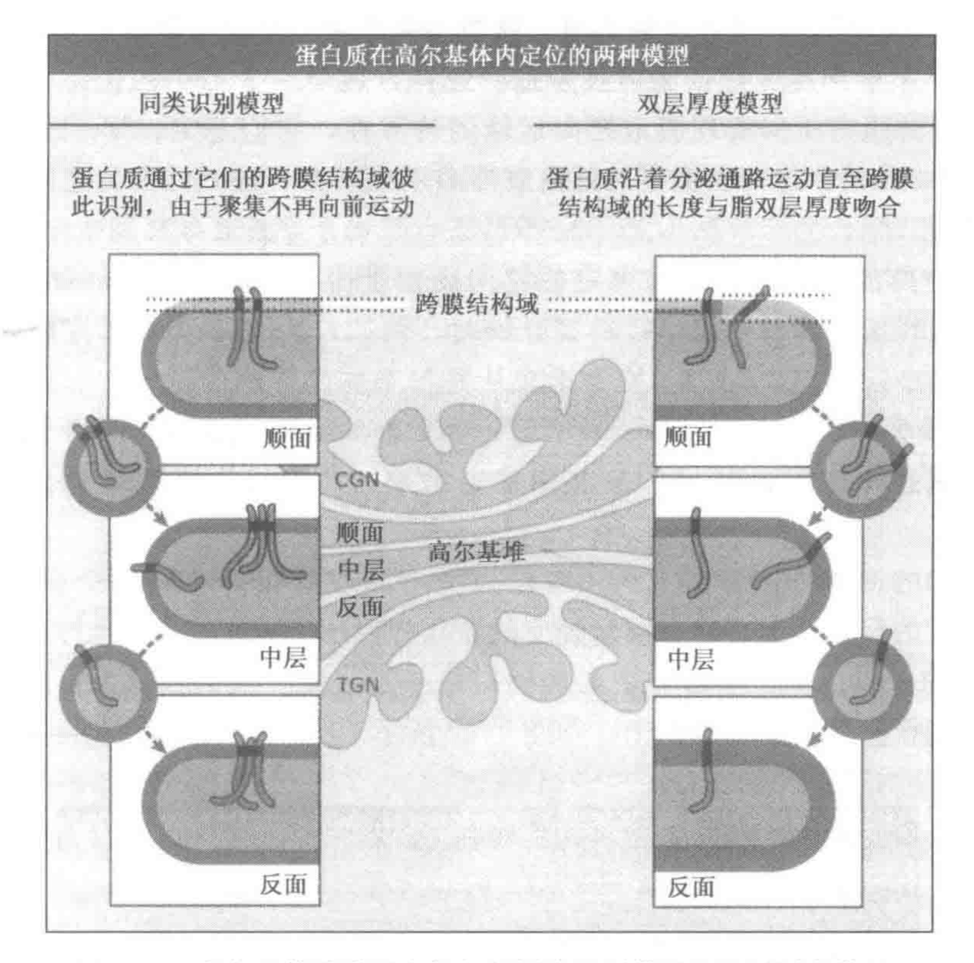


图 4.26　高尔基体跨膜蛋白保留的同类识别模型和双层厚度模型。

相匹配。要做任何进一步移动都必须促使承担任务的侧面氨基酸进入疏水的脂双层，这是非常不适宜的。

支持双层厚度模型的证据来自这样的实验，高尔基酶的跨膜区域被一列亮氨酸替换，它是疏水性氨基酸，与脂双层内部环境相一致。带着一短列亮氨酸的酶被保留在高尔基体了，而带着一长列亮氨酸的酶则移动到了质膜。

重要的是要注意这两个模型并不是相互排斥的，二者可能都运行，将酶集中到各自的高尔基体膜囊中。聚集在一起的酶很少像是要离开一个特殊的膜囊，因为跨膜区域与脂双层配合不当需付出的代价远比单个酶高得多。

4.11　Rab GTP 酶和系链是两种控制膜泡靶向运输的蛋白

关键概念

- 正如 Sar/ARF 家族的单体 GTPase 参与生成运输小泡的包被，另一个家族的 Rab GTPase 参与使这些小泡定向运动到它们的靶膜。
- 膜泡介导的运输的每一步都发现了不同的 Rab 家族成员。
- 被募集或被 Rab 活化的蛋白质被命名为下游因子，包括长纤维样的束缚蛋白（tethering protein）和大的多蛋白复合物。
- 束缚蛋白连接小泡到膜隔室，并使隔室彼此连接。

一旦待运蛋白被选择进入运输小泡，这个小泡必须特异地与路径上下一个隔室融合（见图 4.16）。从给出的大量细胞内膜中进行选择，这是一个不小的任务。细胞至少有两套互相依赖的蛋白质来实现膜泡靶向运输的特异性，它们是 Ras-like GTPase，称作 **Rab** 和**系链（tether）**。这两种类型的蛋白质都必须在膜融合被允许发生之前致力于靶向运输的准确度（融合的细节见 4.12 SNARE 蛋白可能介导膜泡与靶膜的融合）。

Ras-like GTPase 是第一组被确定的靶向运输蛋白（targeting protein）。它们最初被鉴定是在选择影响酵母分泌途径的变异株时。例如，Ypt 1p 被要求在从内质网到高尔基体的运输中起作用，Sec 4p 被要求在从高尔基体到质膜的运输中起作用。在有功能的 Sec 4p 缺失的情况下，起源于高尔基体的运输小泡不能够与质膜融合。哺乳类中的类似物是通过筛选大鼠脑 cDNA 文库鉴定出来的，也因此被称作 Rab（rat brain）蛋白。

迄今已知的 Rab/Ypt 家族成员大约有 12 个在芽殖酵母中，有 60 个在哺乳动物中。对应于已给出的发生在胞吞和分泌途径上的独立的转运步骤的数目，也许有如此充足数目的 Rab 蛋白，以至于至少有一个是能够对每一个步骤负责的。总而言之，Rab 蛋白被集中到它们行使功能的细胞器上，如图 4.27 所示。

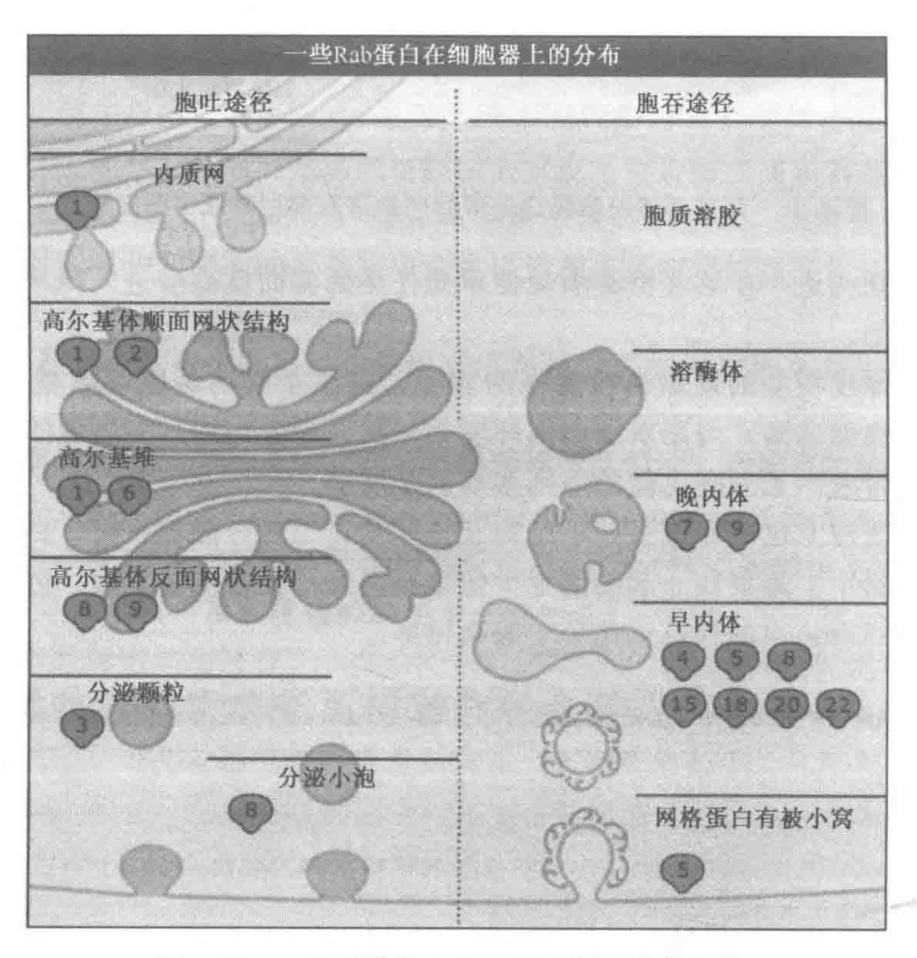


图 4.27 一些哺乳类 Rab 蛋白在细胞器的定位。

如同其他单体 GTPase 的情况那样，Rab/Ypt 蛋白循环于无活性的 GDP 结合形式与有活性的 GTP 结合形式之间（见 MBIO：4-0003）。GDP 结合的 Rab 是在胞质中的，而 GTP 结合的 Rab 是与膜相联系的。如同 Ras，Rab/Ypt 家族蛋白每个都含有一个

GTPase 催化结构域和一个 C 端脂质锚状物（anchor），由 2 个 20 碳长的异戊烯链（prenyl 或 geranyl geranyl）组成，它帮助维持该蛋白质与膜的联合。C 端序列指定该 Rab 蛋白将要结合的隔室。

Rab 蛋白与膜的联合是可调节的。图 4.28 阐明一个模型，这个模型在 Rab/Ypt 蛋白怎样被定位方面有所进展。Rab 以 GDP 结合形式与鸟嘌呤核苷酸去联合抑制物（guanine nucleotide dissociation inhibitor，GDI）形成复合物出现在胞质中。通过隔绝使 Rab 与膜联合的异戊烯链群，GDI 使 Rab 不能与膜结合。

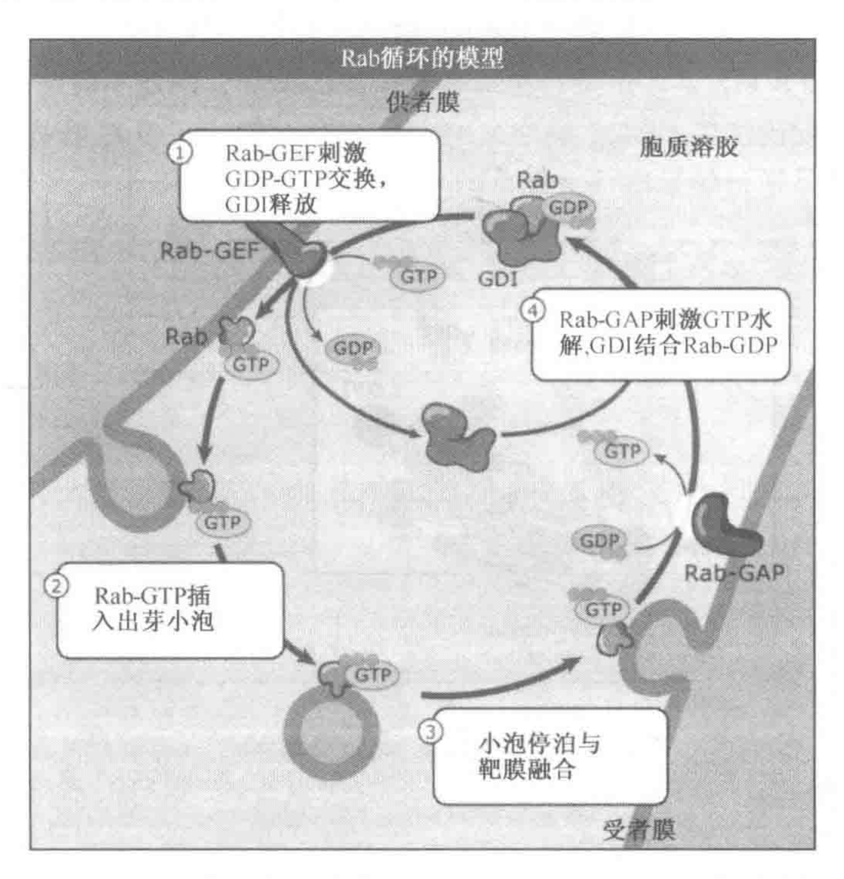


图 4.28　Rab 蛋白在细胞质和膜之间循环的模型（其他蛋白质的运输未显示）。

在有恰当的供者膜的情况下，Rab- GDP 从 GDI 释放出，通过膜结合的鸟嘌呤核苷酸交换因子（guanine nucleotide exchange factor，GEF），GDP 被置换成 GTP（见图 4.28）。然而，仍然不很清楚 Rab 蛋白在这些膜上识别什么。可以相信，膜结合的 GEF 能作为 Rab “受体”，在任何事件中活化了的 Rab-GTP 都可以被并入出芽小泡。

Rab-GTP（和系链）使小泡靶向运动到达受体膜。正确的靶向运动伴随着 GTP 水解，这一过程被对 Rab 特异的 GTPase 活化蛋白激发（Rab-GAP，见图 4.28）。生成的 Rab- GDP 然后被 GDI 吸引，循环回到开始的膜隔室。

用遗传及生物化学分析已鉴定出大量的 **Rab 效应物（Rab effector）**，它们是蛋白质，能优先结合到 Rab-GTP 上以行使它们的下游功能。有一组 Rab 效应物是纤维状的卷曲螺旋蛋白质，在系链（tether）处，它在运输小泡和靶膜之间提供最初的连接（系链连接运输小泡和内质网的细节见 4.15 某些受体从早内体进入再循环，而其他受体在溶酶体中被降解）。

Rab 1 是酵母 Ypt 1p 在哺乳类细胞中的类似物，在从内质网到高尔基体和高尔基体内部的转运中都起作用。Rab 1- GTP 结合到 p 115，后者是一种卷曲螺旋蛋白，是 Rab 的效应物。p 115 的功能之一是将 COPⅠ小泡拴在高尔基体膜上。另外两种卷曲螺旋蛋白 Giantin 和 GM130 也在这一束缚步骤上起作用。用生物化学方法首次确定了 Giantin 和 GM130 与 Rab 1 的相互作用，体外实验使重新组合的蛋白质在试管中相互作用。

如图 4.29 所示，Giantin 通过它的一个跨膜区域被锚定到 COPⅠ小泡的膜上，而 GM130 被锚定到高尔基膜上是通过 myristoylated 蛋白，GRASP 65。Rab 1 结合到 Giantin、GM130 和 p 115 上，但是它在束缚步骤中的确切作用还不清楚。很明显，Rab 1 介导的复合物装配确实将 COPⅠ小泡束缚在高尔基膜上了，虽然仍然不清楚究竟这个束缚是对前行还是逆行转运事件重要。

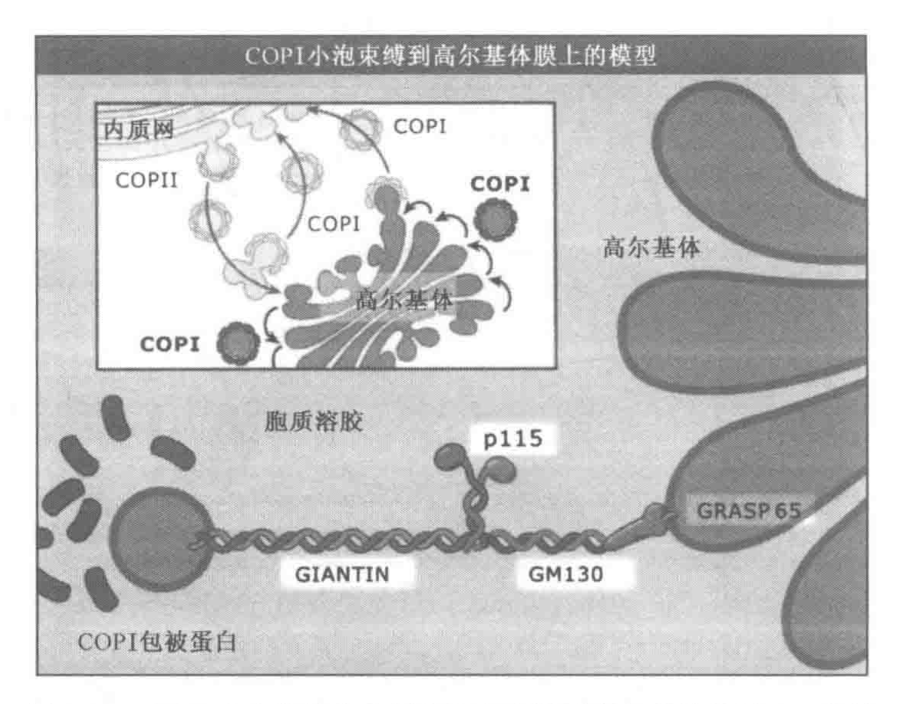


图 4.29　COPⅠ小泡被卷曲螺旋蛋白束缚到高尔基体的膜上。在这个模型中，COPⅠ小泡的运动被这些系链限制，小泡在膜囊之间运动时系链帮助它选择膜囊。Rab 1 结合 GM130、P115 和 Giantin，但是精确的组织形式尚不清楚，故不予显示。

除了纤维系链，还有一个多蛋白复合物大家族也参与到膜泡靶向运输的早期阶段。这些蛋白质包括位于高尔基体进入面（entry face）的 TRAPP，这个 COG 复合物涉及高尔基体内部的转运和质膜上的**胞吐复合物（exocyst）**。

在酵母中，exocyst 是由 7 个蛋白质组成的复合物，它的目标是使后高尔基小泡（post-Golgi vesicle）与正在生长的子芽末端的质膜相互作用，如图 4.30 所示。在哺乳类上皮细胞中，exocyst 的类似物位于上皮顶端和基底外侧区域连接处（蛋白质在极性细胞中转运的细节见 4.18 极性上皮细胞运输蛋白质到顶部和基底外侧部质膜）。通过变异或者注射抑制性抗体来阻止 exocyst 活动，都会阻止或减缓分泌性蛋白的释放。这种作用很像是分泌性运输小泡定向到质膜上的融合部位这一过程失败的结果。

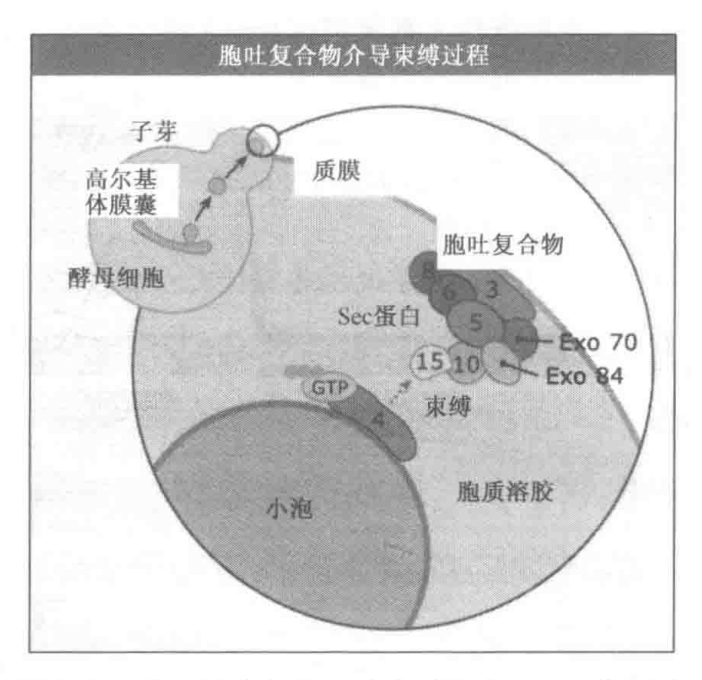


图 4.30 胞吐复合物是一种胞质蛋白，介导分泌小泡在质膜上的束缚。

4.12 SNARE 蛋白可能介导膜泡与靶膜的融合

关键概念

- SNARE 蛋白在体外实验中对于特异性的膜融合是必要和充分条件，但是其他的辅助蛋白可能是体内需要的。
- 运输小泡上的 v- SNARE 与靶膜隔室上性质相同的 t- SNARE 相互作用。
- v- 和 t- SNARE 之间的相互作用被认为是使膜足够靠近，以便它们能够融合。
- 融合之后，ATPase NSF 拆散 v- 和 t- SNARE，v- SNARE 再循环回到靶膜隔室。

Rab 和系链（tether）一开始就携带运输小泡到它可以与之融合的膜隔室（见 4.11 Rab GTP 酶和系链是两种控制膜泡靶向运输的蛋白质）。虽然这两种膜并列在一起，但这只是靶向运输事件，并不自行导致融合。膜融合更密切地与 **SNARE** 相关，SNARE 是细胞器特异的膜蛋白家族。融合在两个水平上被调节。将膜泡束缚到目的隔室需要 Rab 和束缚复合物，它至少为膜泡和靶膜提供最初的特异性相互作用。停泊是由 SNARE 蛋白介导的，它提供进一步的特异性和使膜足够靠近以致融合。为什么需要两个系统尚不知道。

SNARE 是膜内在蛋白，在 C 端有一个膜锚（membrane anchor）（偶尔是脂），N 端伸出到胞质中。根据它们各自出现在膜泡中还是在靶膜中，SNARE 蛋白可以被划分为 v- SNARE 或 t- SNARE。v- SNARE 被并入出芽的运输小泡（例子见 4.6 COPⅡ-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输）。

SNARE 蛋白最初被鉴定为神经突触小泡的组成成分，突触小泡实质上是存在于神经元突触部位的分泌性运输小泡。SNARE 具有彼此形成复合物，以及与 NSF 因子（N-othl-maleimide-sensitive factor）和可溶性 NSF 附属蛋白（SNAP）形成复合物的能

力，在此基础上对 SNARE 蛋白进行了纯化（见EXP：4-0006）。NSF 和 SNAP 先前在体外的膜融合事件中已被确定起着还算重要的作用。质谱鉴定显示 SNARE 是存在于所有真核细胞中的一个蛋白大家族的成员，有趣的是，每个家族成员都有着特征性地被限定的分布形式，像 Rab 蛋白那样与特定的胞内细胞器联合，如图 4.31 所示。酵母编码 SNARE 蛋白基因的变异株在胞吞和胞吐途径中膜转运的特定步骤上被抑制。阻断发生的位置是给定的 SNARE 将结合上去的某个细胞器。

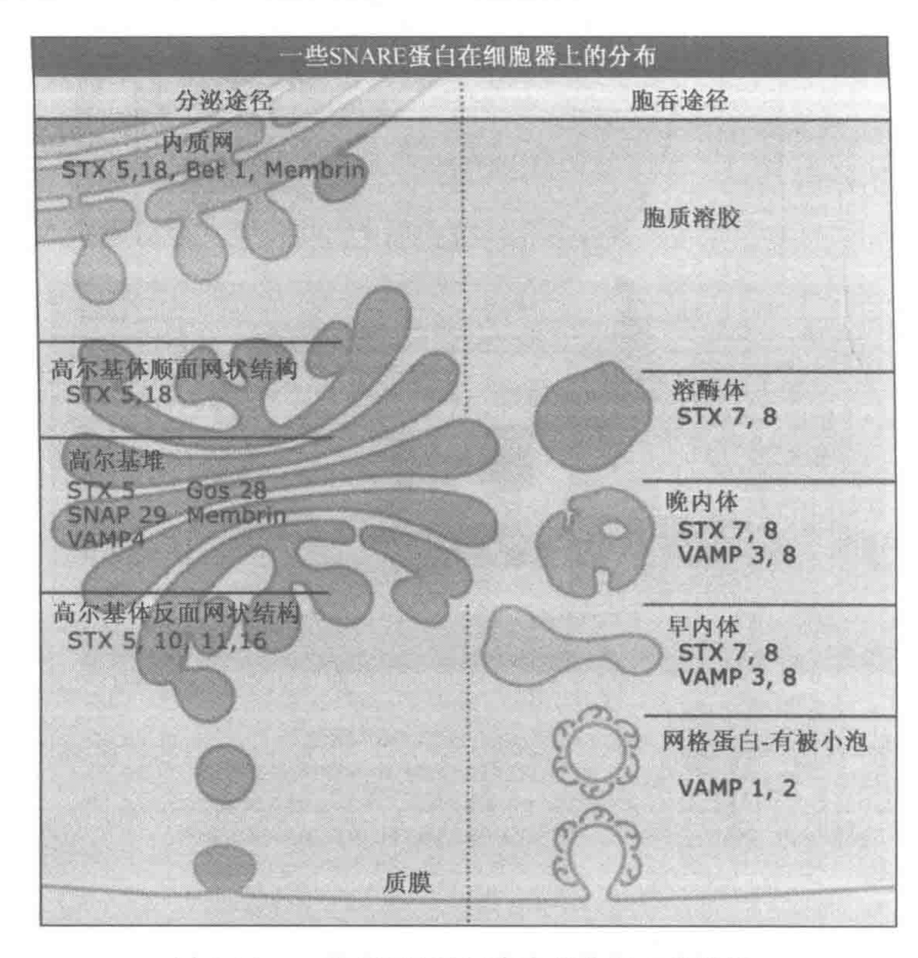


图 4.31　一些 SNARE 蛋白在细胞器上的定位。

SNARE 假说被提出来解释 SNARE 怎样能够使运输小泡与它们的靶膜融合具有专一性。假说指出，在膜泡中的 v- SNARE 与它在靶隔室的同类物 t- SNARE 相互作用，这个特异性的相互作用导致膜融合。现在已经鉴定出了在哺乳类和酵母中被所有膜泡介导的运输步骤所使用的同类 SNARE 对。用酵母做的实验提供了基因方面的证据，证明 SNARE 涉及所有的细胞膜融合事件。体外实验有某些证据说明 SNARE 相互作用的特异性：只有那些有效地参与复合物形成的 SNARE 才是负责已知的细胞内运输事件的分子。广泛的基因组搜索已经展现了在酵母、果蝇中表达的所有 SNARE，和人类中表达的 8～20 种 SNARE，依不同的有机体而不同。

SNARE 蛋白怎样能够将膜带到一起去融合？SNARE 作用机制的关键是依赖它们的 N 端胞质区域，这一区域有与同类的 SNARE 形成卷曲螺旋的倾向。最重要的是，螺旋平行排列，这意味着同类的 SNARE 相互作用会带动膜锚定的 C 端区域紧靠在一起，如图 4.32 所示。由膜泡和靶膜之间如此相互作用的螺旋构成的“玫瑰花形物”能够使膜足够地靠近以至融合。在体外，仅含有一类 v- SNARE 的脂质体能够跟含有与

它同类的 t- SNARE 的脂质体融合。这一结果提示 SNARE 蛋白对于体外融合是充分条件。然而不清楚在体内是否还需要其他蛋白质。

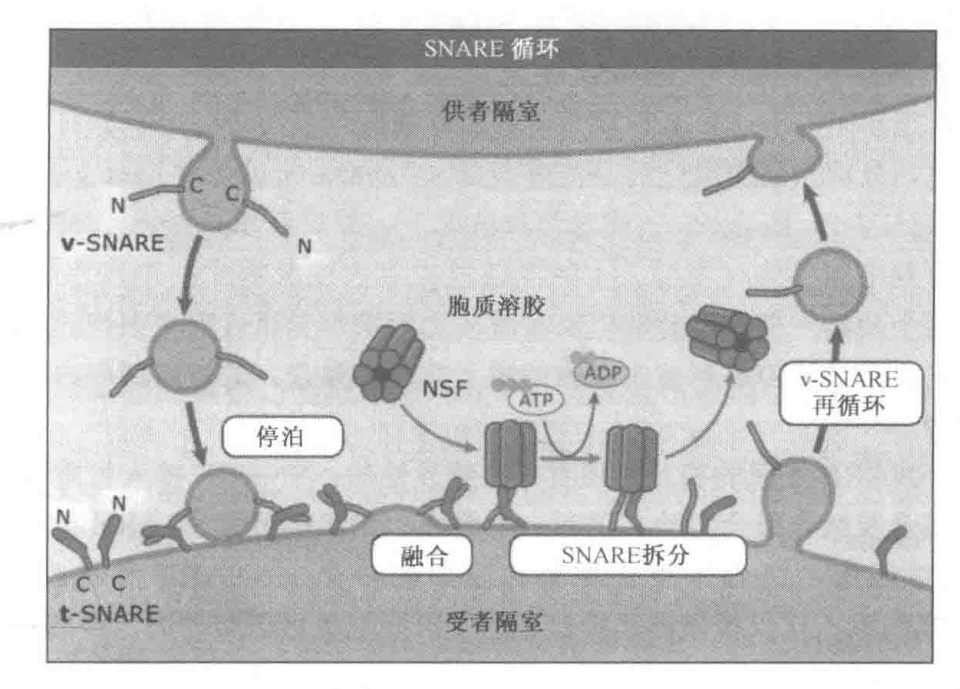


图 4.32　v-SNARE 在供者膜和受者膜之间的循环。进入运输小泡的 v-SNARE 与靶膜上的 t- SNARE 相互作用。这种相互作用使膜靠近，导致融合。融合之后，SNARE 对被 NSF/SNAP 解开，这个反应需要 ATP 水解，v-SNARE 返回供者膜。

SNARE 复合体的晶体结构显示，卷曲螺旋区域是由四条螺线构成的一束。v-SNARE 提供一条螺线，t- SNARE 提供三条。如图 4.33（见图版）所示，神经细胞的

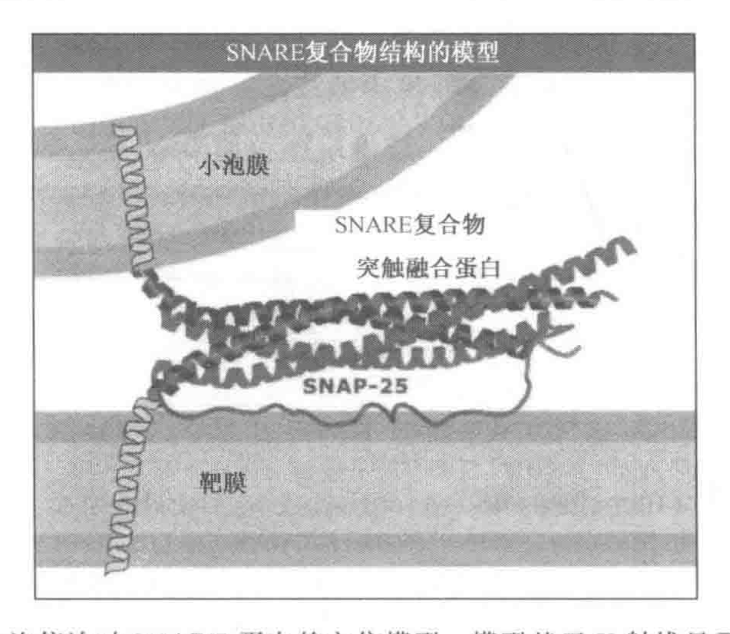


图 4.33　小泡停泊时 SNARE 蛋白的方位模型。模型基于 X 射线显示的 SNARE 蛋白胞质区域的结构，它形成 4 螺旋线束。这里 t-SNARE 是突触融合蛋白（syntaxin）和 SNAP-25；v-SNARE 是 synaptobrevin。据推断它们插入膜。褐色的绞绳被认为是两根 SNAP-25 之间的连接。引自 Sutton，R. B.，et al. *Nature*. 1998. 395：347-353。

t- SNARE 是非同寻常的，在那个突触中 t- SNARE 提供一条螺线，SNAP-25 提供两条螺线。在所有的其他情况下，这后两条螺线是已被划归为 t- SNARE 轻链的两条 SNARE。因此是一条 v- SNARE 与 t- SNARE 的一条重链和两条轻链相互作用（SNARE 结构的细节见STRC：4-0001）。

结构分析显示了 SNARE 复合物与包膜病毒的融合蛋白之间出乎意料的关系。关于这些融合蛋白，最深入地研究过的是流感病毒（fluenza virus）的 hemagglutinin 和人免疫缺陷病毒（HIV-1）的 gp120。在这两种情况下，独立亚单位彼此形成长长的螺旋形结构，当结合到细胞受体时受低 pH 激发经过构象改变暴露出一个疏水性“融合肽”。螺线区域有两个功能：掩蔽融合肽以及在激活之后携带它靠近宿主细胞的膜。用这种方法，病毒使它自己的膜停靠到宿主细胞的膜上并与之融合，通过向细胞内注入病毒基因开始感染过程。

v- 和 t- SNARE 之间的相互作用看来是特异性的。SNARE 掺入脂质体已经被用于所有的体外结合及融合组合实验。仅有一个例外，相互作用的 SNARE 在酵母细胞中进行它们的位置匹配，脂质体融合要求有泡中的一个 v-SNARE 和靶膜中的三个 t-SNARE。4 螺线束不仅仅提供催化膜融合的手段而且也可以帮助决定哪些膜进行融合。

SNARE 中的相互作用是可调节的。例如，t- SNARE 有 N 端序列，它能够强烈地抑制某些细胞中 SNARE 复合物形成的速率。这些序列是调节蛋白的靶物，调节蛋白决定何时 SNARE 被允许相互作用。另一个例子是调节蛋白结合到已装配好的 SNARE 复合物上。这样的调节性相互作用对于决定融合的时机是很重要的，在发生在神经元或胰腺腺泡中的调节型分泌的情况下，融合时机具有显著意义（见 4.19 某些细胞储存蛋白质用于分泌）。

融合发生之后，卷曲螺旋的 SNARE 复合物被拆散（unraveled），v-SNARE 再循环回到起点的膜参与以后的膜泡出芽过程，如图 4.32 所示。拆散是一个高度需能的过程，因为 SNARE 复合物十分稳定甚至抗拒低浓度的强离子型去垢剂，如像十二烷基磺酸钠（SDS）。NSF 是胞质溶胶的 ATPase，它催化拆散。NSF 蛋白形成一个圆筒状的六聚体复合物（hexameric complex），有中心通道（central channel）。NSF 通过 SNAP 蛋白间接结合到 SNARE 上。用纯化的蛋白质或将蛋白质嵌入生物膜的体外实验表明，ATP 被 NSF 水解使 4 螺线束中的螺旋分开。拆散的机制尚不清楚。一种特别的可能性是 SNARE 结合到 NSF 中心通道的壁上，然后 ATP 水解撑开腔洞，这样把互相缠绕的 SNARE 拉开。

v- 和 t- SNARE 分散之后 v- SNARE 返回供者膜。提出返回观点是由于发现 v- 和 t- SNARE 不在单边的膜上积累也不被迅速降解。至于 v- SNARE 如何被转运，这里有两种可能性。一种是它们利用自身胞质区域的回收信号，成为再循环小泡中的被运载物质。有某些证据指证 SNARE 蛋白中的回收信号，但是这个系统怎样运作在很大程度上是未知的。另一种是认为一些 v- SNARE 可以在两个方向上行动，指引向前运动的膜泡到靶膜和朝后运动的膜泡到出发时的膜。在任一种情况下，SNARE 都如同一些质膜受体那样，连续地往返循环于它们工作的隔室之间。

4.13 胞吞过程通常由网格蛋白-有被小泡介导

关键概念

- 网格蛋白三脚蛋白复合体的逐步装配帮助提供机械手段使膜变形成为有被小窝。
- 各式连接复合物通过结合到分选信号和网格蛋白三脚蛋白复合体，为转运提供选择荷载物的方法。
- 动力蛋白家族的 GTPase 帮助有被小泡从膜上释放。
- 在停泊和融合之前，去包被 ATP 酶移除有被小泡上的网格蛋白包被。

胞吞提供了最初的途径，使胞外的大分子和质膜蛋白被内化得以进入细胞（见 4.3 关于胞吞途径）。各种形式的胞吞给出了膜运输的另一个例子，质膜上有关的位点凹陷形成芽泡产生运输小泡。胞吞只是航向相反，除此之外与分泌途径上导致膜泡从细胞器膜形成的总体框架相同。最具特征性的胞吞机制涉及由**网格蛋白（clathrin）**组成包被的运输小泡，在一起的还有一种或更多类型的**接头蛋白复合物（adaptor complex）**，它连接网格蛋白与膜。这些接头蛋白也参与选择待运物质进入新生的胞吞泡。网格蛋白和接头蛋白复合物从胞质溶胶补充到出芽小泡中。

网格蛋白-有被小泡起源于质膜，小泡里的荷载分子（cargo molecule）经常是一些物质的受体，是为了使胞外配体物质快速地被细胞吸收。实际上，受体被网格蛋白-有被小泡选择性吸收是膜运输时荷载物选择的第一个例子。网格蛋白-有被小泡也介导高尔基体反面网状结构（TGN）处的转运；这里的膜泡与介导胞吞的膜泡相比有着不同的接头蛋白，携带不同的荷载蛋白（见 4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构）。

有被小窝（coated pit）和**有被小泡（coated vesicle）**是在 20 世纪 60 年代早期用电子显微镜分析蚊子卵母细胞时初次观察到的。卵母细胞吸收和贮存卵黄颗粒用于进一步的胚胎发生，吸收速度如此之高以至大量卵母细胞表面含有网格蛋白-有被小窝，如图

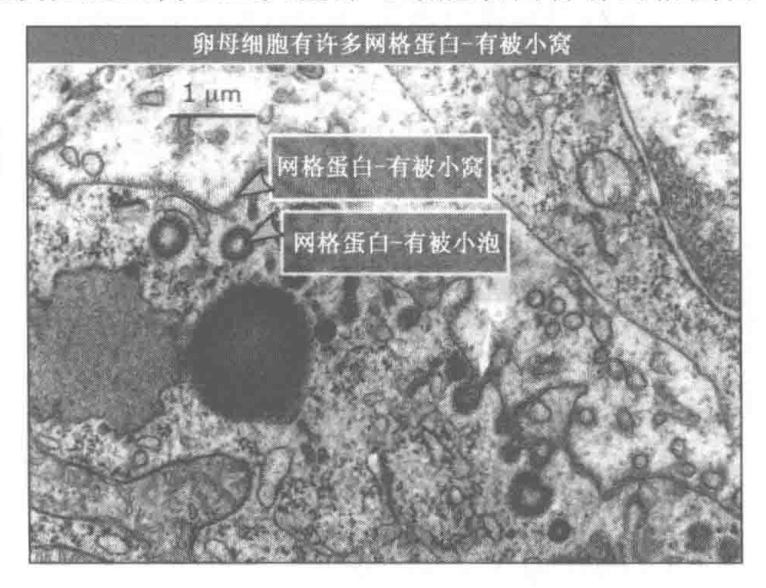


图 4.34 卵母细胞表面的网格蛋白-有被小窝和小泡透射电镜照片。照片复制自 *The Journal of Cell Biology*，1964，vol. 20，pp. 313-332，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

4.34 所示。

20 世纪 70 年代早期，在神经突触部位，来自前突触膜的突触小泡再循环时，包被结构用冷冻置换（freeze-substitution）技术显示出来（突触小泡的细节见 4.19 某些细胞储存蛋白质用于分泌）。包被由连锁的蛋白质阵列构成，如图 4.35 所示。这些规则的阵列起名为“网格蛋白”（clathrin，由 clathrate 而来，用于描述网格）。

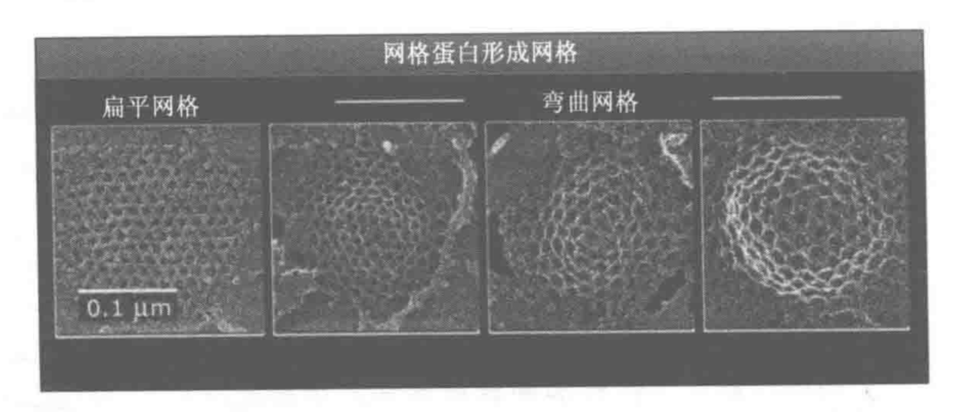


图 4.35　电镜照片显示质膜上网格蛋白-包被的结构。网格蛋白构成的网络在弯曲度方面有变化。每幅照片显示不同的网络。照片由 Washington 大学医学院的 John Heuser 惠赠。

网格蛋白-有被小泡最早是在 1969 年从脑中分离出来的，后来初步发现网格包被由两种蛋白质组成。网格蛋白重链（180 kDa）和轻链（30 kDa）以相等摩尔数存在于包被上。电镜显示网格蛋白形成一种很有特色的有三条腿的复合物（three-legged complex），称作**三脚蛋白复合体（triskelion）**，如图 4.36 所示。三脚蛋白复合体的每条“腿”由网格蛋白的一条重链和一条轻链组成。三脚蛋白复合体呈三角形，靠近三脚中心顶点是轻链结合部位。由中心向远处延伸的腿全部含有重链。

虽然在体内其他蛋白质可以帮助在膜上装配网格蛋白包被，但是在体外，网格蛋白还是表现出明显的自我组装成网络的能力。从细胞分离出网格蛋白，在适当的盐和 pH 条件下孵育，将自动形成空的网格蛋白笼子（cage），形状看起来与体内见到的围绕着膜的笼子相似。用纯化的重链和轻链重建的网格蛋白笼子显示三脚蛋白复合体形成六边形和五边形的包被结构，如图 4.36 中低温冷冻电镜所显示的那样。这些笼形物与体内围绕着膜泡的包被十分相像，这表明网格蛋白的重链和轻链对于网格的形成既是必要的也是充分的。每个三角形顶端是单独的三脚蛋白复合体的结节，五边形或六边形的每一边包括来自不同的三脚蛋白复合体的四条腿。

由这样的几何形状构成的六边形网格蛋白格子（lattice）是扁平的，但是采用五边形就产生了必要的弯曲来形成一个笼子（见图 4.36）。然而在体内，导致形成充分弯曲的有被小窝的事件的顺序仍不知道。有一个模型认为，在平坦的包被中，一些六边形被进行了某些修饰形成五边形，以便引进曲率。另一个模型称，是蛋白质而不是网格蛋白将曲率引进膜，这个弯曲在适当的位置通过五边形的装配被锁定。

网格蛋白笼子的装配不需要供能。因此这个装配被认为与可利用的自由能有关系，该自由能可以帮助驱使膜凹陷，形成膜泡。然而，在有被小泡形成之前质膜变形时，接头蛋白复合物也起着关键的作用。

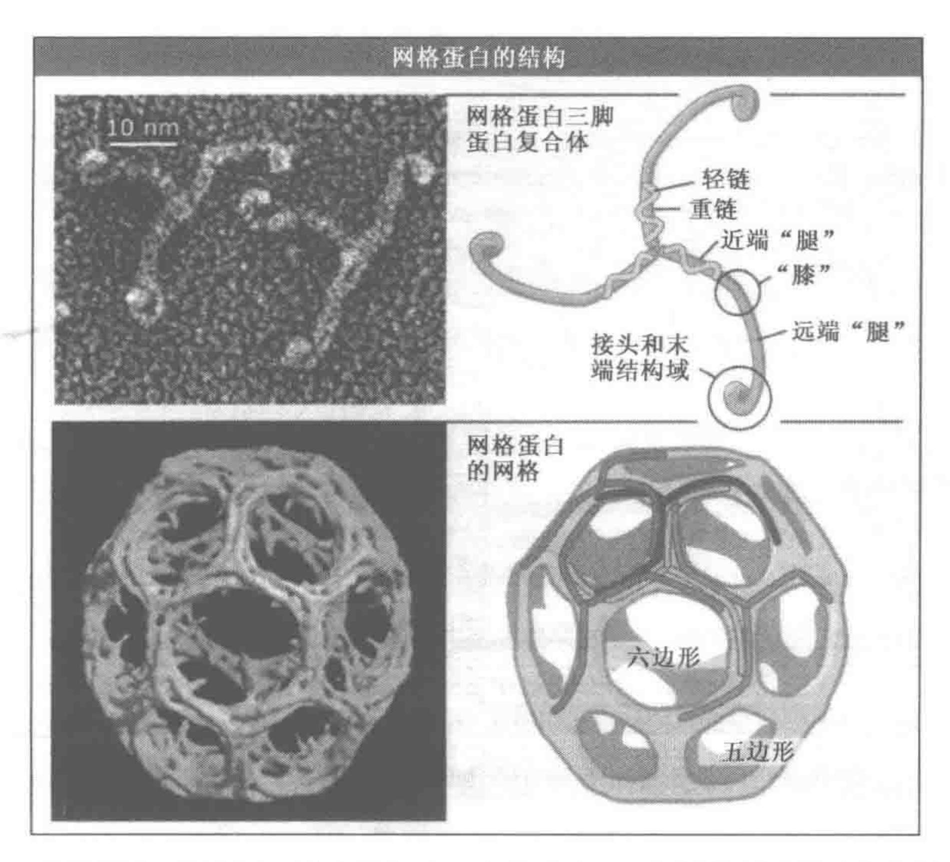


图 4.36 网格蛋白三脚蛋白复合体装配成闭合的笼子。三脚蛋白复合体结构能形成五边形，也能形成六边形格子，以便能生成闭合的笼子。为简便起见，最下面右边的长方形照片中没有显示轻链。照片：三脚蛋白复合体，由 Washington 大学医学院的 John Heuser 惠赠，网格蛋白笼子：复制自 Smith，C. J.，Grigorieff，N.，and Pearse，B. M. F. Clathrin coats at 21Å resolution…*EMBO J*. 1998. 17：4943-4953。获得 Oxford 大学出版社许可。照片由 MRC 分子生物学实验室的 Barbara Pearse 惠赠。

网格蛋白并不直接与膜或膜蛋白相互作用。代替各式各样接头蛋白复合物的是中介物，它连接网格蛋白亚单位和位于待运蛋白胞质端的分选信号，如图 4.37 所示。不同的转运步骤有不同的接头蛋白执行选择跨膜蛋白的任务（见 4.14 接头蛋白复合物连接网格蛋白和跨膜的待运蛋白）。

出芽的网格蛋白-有被小泡最后必须从质膜上切断（scission）来完成胞吞。切断是需能过程，由**动力蛋白（dynamin）**介导，它是一种 GTP 酶，最初在果蝇（*Drosophila shibire*）的变异体中被鉴定出来。这个变异体在非允许温度下不能正常飞行。当该变异体在非允许温度飞行时，它的神经细胞突触部位的有被小窝带有长颈，不能从质膜脱离，见图 4.38。这样的结构在允许温度下并不出现。这一观察提示，*shibire* 变异体的这种现象是由于突触小泡成分没有能力从质膜上脱离下来进入再循环，随之有效地停止了神经传导。这种 *shibire* 变异被追查出是动力蛋白缺陷。体外实验中，当存在不可水解的 GTP 同系物时，纯化的哺乳类动力蛋白在质膜上便组装成这些长颈。

"Collers" 是 *shibire* 动力蛋白结构的更短的变体，已被发现围绕着普通的网格蛋白-有被小窝的颈部。动力蛋白看来是从胞质溶胶补充进来，形成螺旋形的结构围绕着出芽的有被小泡的颈，帮助介导网格蛋白-有被小窝从质膜切断，如图 4.39 所示，但是切断的机制仍不知道。有一个模型是，通过水解 GTP 这些螺旋形结构能够压缩，从而促

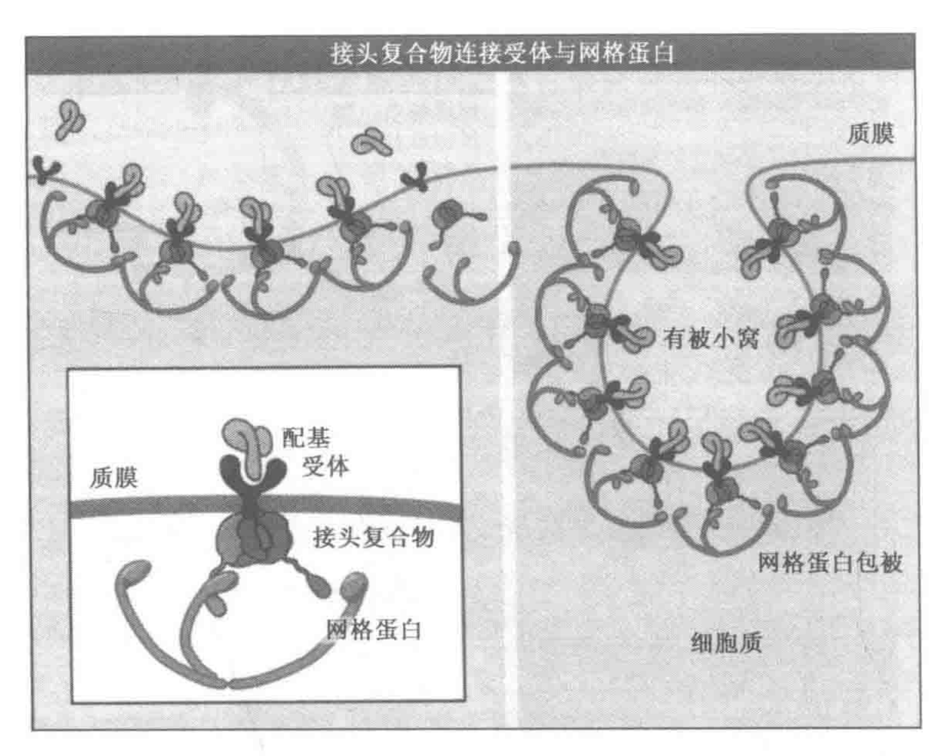


图 4.37　网格蛋白与接头蛋白相结合，接头蛋白识别待运蛋白胞质端的分选信号。

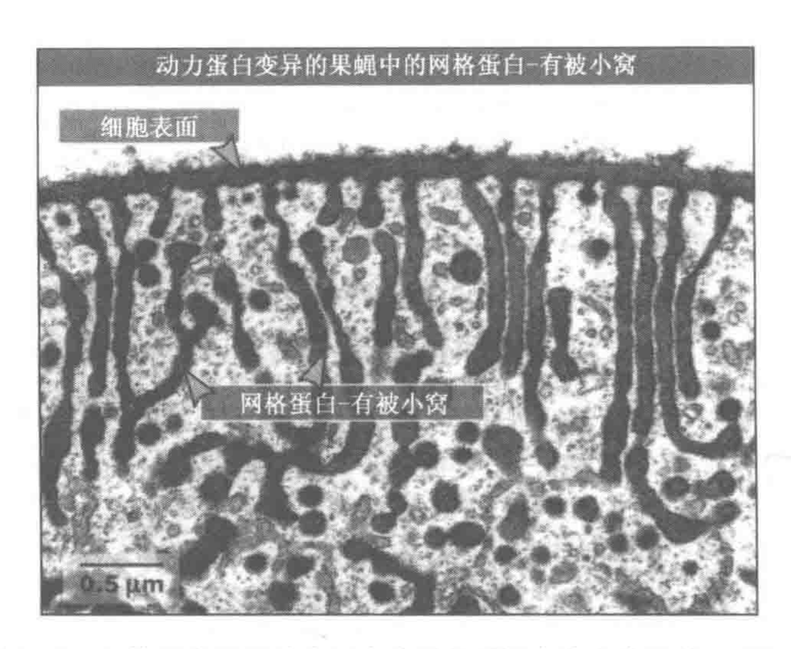


图 4.38　电镜照片显示动力蛋白变异的果蝇在非允许温度 30 ℃ 下的网格蛋白-有被小窝。请注意从细胞表面延伸的管状网格蛋白-有被芽体。这些拉长的有被小窝无法掐下来，因为变异的动力蛋白在这个温度下不能工作。照片复制自 *The Journal of Cell Biology*，vol. 97，pp. 499-507，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。照片由 Kyushu 大学的 Toshio Kosaka 博士惠赠。

进膜融合事件，这是释放新的网格蛋白-有被小泡所需要的。另一个模型是，动力蛋白间接地促进有被小窝脱离，也许是在膜泡形成的过程中通过补充其他的分子或改变有被小窝的构造来实现的。无论是哪种情况，毫无疑问，动力蛋白在网格蛋白-有被小泡从质膜释放，也许还有在高尔基体反面网状结构释放的过程中，都是一个关键成分（见

4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构)。

释放之后，网格蛋白-有被小泡可以与肌动蛋白细胞骨架 (actin cytoskeleton) 元件相互作用，细胞骨架协助膜泡运动进入胞质溶胶。新形成的胞吞小泡能够作为肌动蛋白纤维的组装位点，肌动蛋白纤维提供了这样的能动性。虽然这种运动所必需的物质还有待确认，但已经清楚的是，许多被补充到网格蛋白-有被小泡的辅助蛋白，突出的如动力蛋白，能在肌动蛋白纤维组装中起核心作用。

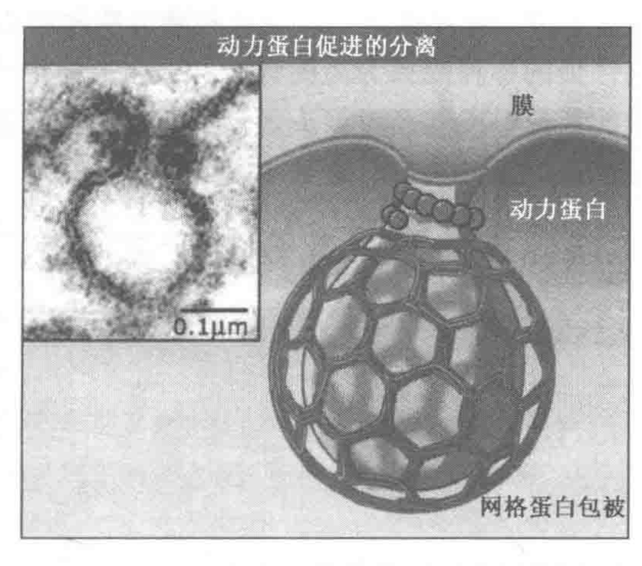


图 4.39 动力蛋白能围绕出芽小泡的颈形成螺旋形结构，使膜切断。照片由 Yale 大学医学院的 Pietro de Camilli 惠赠。

网格蛋白-有被小泡形成之后，为了使小泡定向运动到路径上的下一个隔室，即早内体，小泡的包被必须移除。去包被 (uncoating) 涉及两种蛋白质。“去包被 ATP 酶” (HSC70) 是一种胞质溶胶酶，是热激蛋白 (heatshock protein) Hsp70 家族成员，auxilin 是与去包被 ATP 酶相互作用的一种蛋白质，如图 4.40 所示。去包被的确切机制还没有解决，但是似乎是随着与 Hsp70 结合，网格蛋白-有被小泡去稳定及解除联合，这应该是与 ATP 酶这个家族的

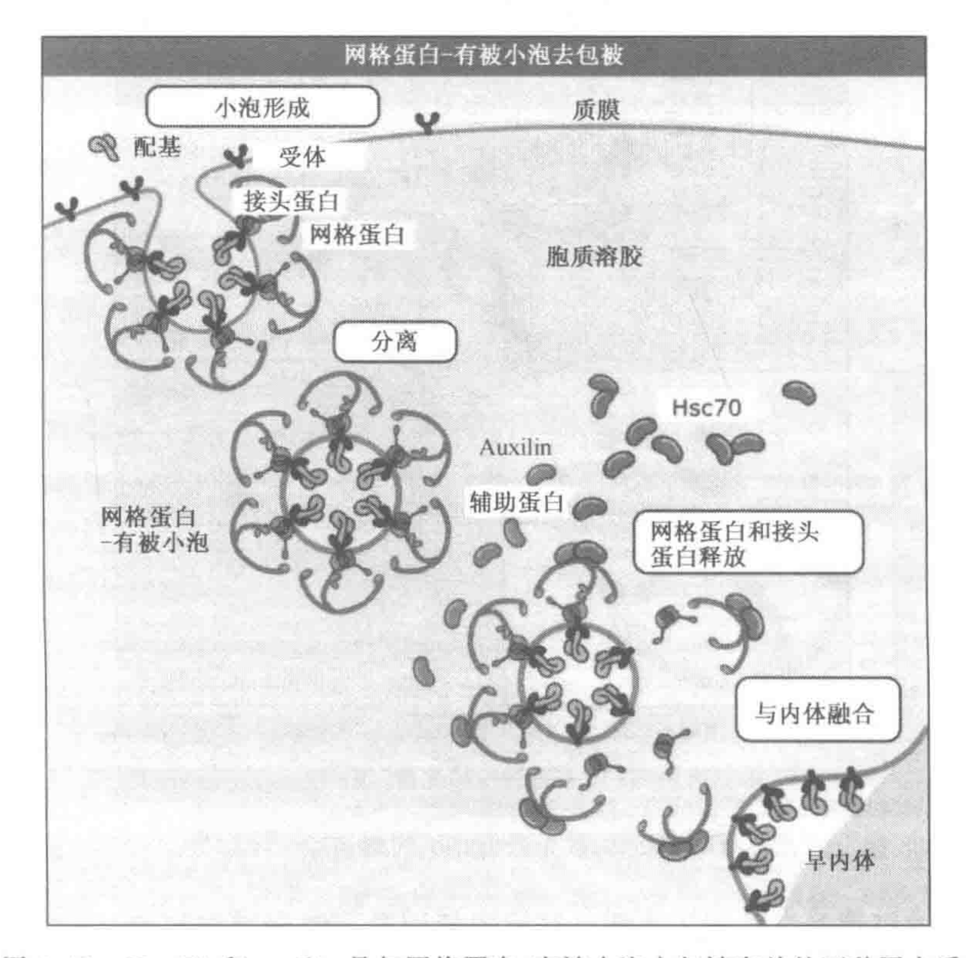


图 4.40 Hsc 70 和 auxilin 是与网格蛋白-有被小泡去包被有关的两种蛋白质。

结合能力，以及在蛋白质合成和降解期间的蛋白质折叠和去折叠反应中，Hsp70 作为蛋白伴侣的那种使更为高度有序的结构去稳定的功能相一致的。酸性磷脂的水解也能对包被的装配，尤其是对接头蛋白复合物的释放起作用（见 4.14 接头蛋白复合物连接网格蛋白和跨膜的待运蛋白）。

4.14 接头蛋白复合物连接网格蛋白和跨膜的待运蛋白

关键概念

- 接头蛋白复合物结合到跨膜的待运蛋白的胞质端、网格蛋白和磷脂上。
- AP 家族接头蛋白是两个结合素和两个更小的蛋白质构成的异四聚体复合物。
- AP 接头蛋白结合到待运蛋白胞质端的分选信号上，这些信号的最大特征是含有酪氨酸或异亮氨酸残基。
- 接头蛋白复合物使受体和它们的配体能选择性地迅速内化。

接头蛋白复合物（adaptor complex）连接跨膜的待运蛋白的胞质端和网格蛋白。最为人熟知的接头蛋白是那些“AP”家族成员，AP 家族有四个主要类别。这些接头蛋白呈现特征性的细胞内分布，如图 4.41 所示。AP-1 和 AP-2 已被确定是脱离下来的网格蛋白-有被小泡的主要构成成分。AP-1 集中在高尔基体反面网状结构（TGN）和内体，而 AP-2 仅限于质膜。AP-1 在可溶性溶酶体成分和某些膜蛋白从 TGN 向内体和溶酶体转运中起作用（见 4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构）。AP-2 在胞吞中起作用。

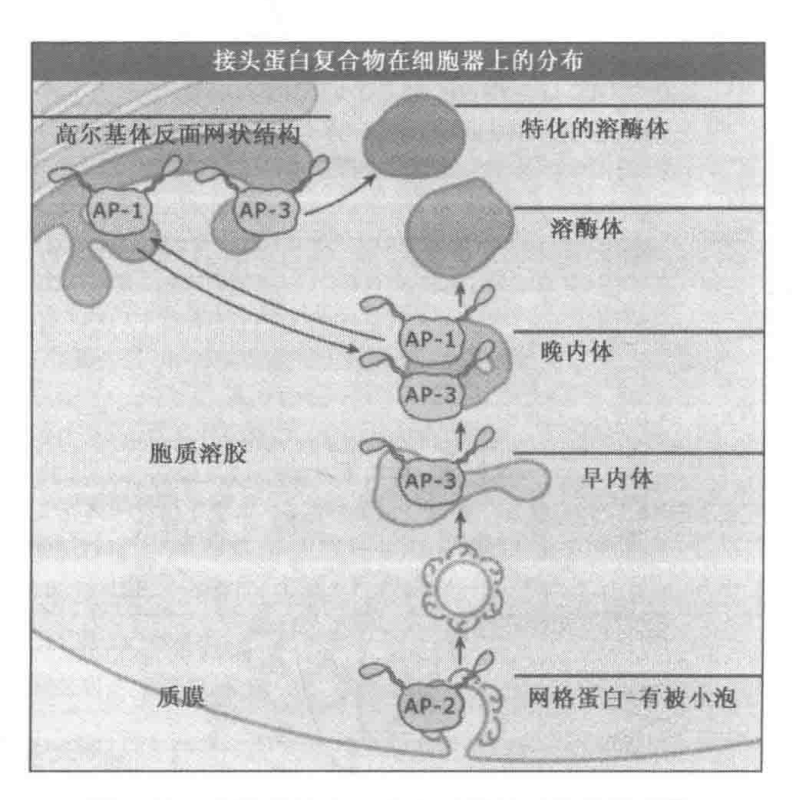


图 4.41　不同的接头蛋白在不同的运输步骤工作。

AP-3 是通过搜寻克隆的接头蛋白核酸序列同系物数据库鉴定的。如同 AP-1，AP-3 与 TGN 配合参与某些特殊的溶酶体的生物发生。例如黑色素体（melanosome），它

在黑色素细胞中储存色素。皮毛颜色缺陷小鼠通常有 AP-3 亚单位的变异。第四个复合物 AP-4 的功能还不知道。

不同的接头蛋白复合物通过与特定的磷脂相互作用结合到一定的细胞器上，至少部分是这样。AP-2 结合 PIP2（phosphatidylinositol-4，5-bis-phosphate，PI4，5P 或 PIP2)，一种在质膜的胞质面优先产生的脂类。相比之下，AP-1 结合 PI4P，它最初是在细胞内膜，例如高尔基体和内体的膜上发现的。与适当的脂相互作用也能诱导形态变化，使接头蛋白能够更好地与它们的待运物质相互作用，进而保障其特异性。

接头蛋白是含有四个亚单位的复合物。其中两个大亚单位称作**结合素蛋白（adaptin)**。如图 4.42 所示，AP 家族的所有成员都有同样的异四聚体结构。通过电镜和 X 射线晶体学观察和分析纯化的复合体，显示了异四聚体的整个形状。它是一个大的砖状物（brick）或“箱形”（trunk）区域，从这里伸出两个附属物（“耳”)，耳通过长长的“铰链”（hinge）区附着到箱体上。所有的四个亚单位都包含在箱体内，而铰链和附属物区域则是其中两条链的扩展（在 AP-1 中是 β-和 γ-链，在 AP-2 中是 α-和 β-链，在 AP-3 中是 β-和 δ-链）。

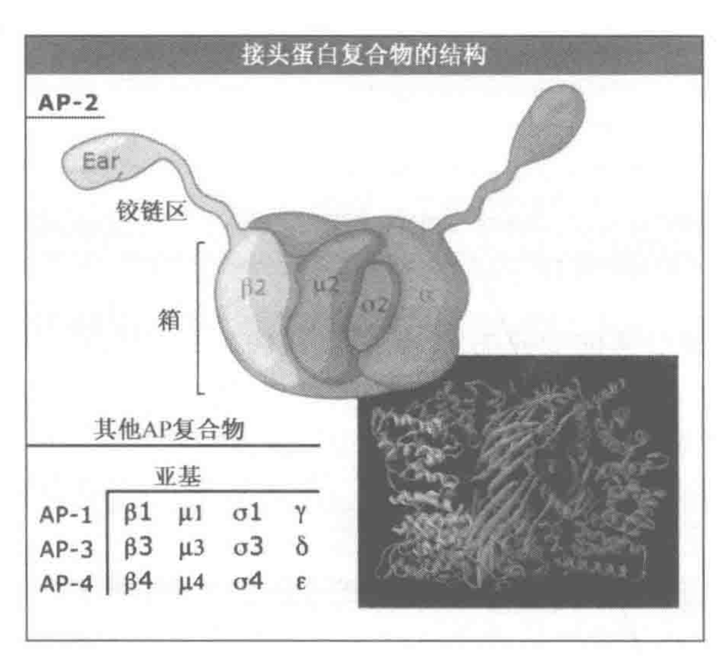


图 4.42 接头蛋白复合物参与网格蛋白-有被小泡介导的运输。接头蛋白是异四聚体结构，由箱形部位和铰链区组成，箱形部位结合膜受体胞质端的信号，铰链区连接有“耳”，耳与网格蛋白相结合。X 射线结构图仅是箱形部位的图像。图像改编自 *Cell*，vol. 109，Collins，B. M.，et al.，Molecular Architecture and Functional…，523-535。Copyright 2002，获得 Elsevier 许可。

接头蛋白复合物的不同部位有着截然不同的功能。铰链和附属物区域含有与网格蛋白中称作 β-推进器区的特定部位相结合的位点。这些区域也允许接头蛋白复合物与各种调节网格蛋白-有被小泡形成的辅助蛋白相互作用。

AP-2 的箱形物与质膜受体的胞质端结合，从而将网格蛋白包被与质膜相连接。AP-2 的磷酸化暴露出它与受体末端结合的位点。有一种特异的激酶（称为 AAK 1）在包被装配期间使 AP-2 磷酸化，暴露出 μ 亚单位，它是接头蛋白的一部分，能识别胞吞受体上的有被小窝内化信号。这种磷酸化也暴露对磷酸肌醇（phosphoinositide）的结

合位点，质膜中的这些负电性脂为 AP-2 复合物提供了附加的锚。

接头蛋白特异地结合到待运蛋白胞质端的分选信号上，如图 4.43 所示。对接头蛋白 AP-2 在选择待运物质进入有被小泡的过程中起的关键作用，人们有着最充分的认识。与 AP-2 μ 链结合的分选信号仅在掺入网格蛋白-有被小泡的蛋白质中发现，故被称作胞吞分选信号。AP-2 似乎结合分别以酪氨酸和异亮氨酸为基础的（dileucine-based）两种不同类型的分选信号。

主要的分选信号和接头蛋白相互作用	
分选信号	结合:
Tyr-X-X- 疏水序列 (YXXØ)	接头蛋白复合物的μ亚基
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	其他附属蛋白(ARH、Dab2)
[Asp/Glu]-X-X-X-Leu-[Leu/Ile] (双亮氨酸)	GGA, 其他的?
泛素单体	其他附属蛋白(Eps15)

图 4.43　已知的胞吞分选信号既有酪氨酸型的，也有异亮氨酸型的。X 代表任意氨基酸残基。

酪氨酸型信号（tyrosine-based signal）是首个被鉴定的膜分选信号，通过分析不能够进入网格蛋白-有被小窝的变异的 LDL 受体而确定（见EXP：4-0007）。变异发生在一段含有酪氨酸的短序列中，该序列对物质吸收是必要和充分的。变异的受体缺乏内化显示这段序列对胞吞是必要的。在一个实验中，人工设计了一个由分选序列和一个质膜蛋白序列组成的蛋白质，这个质膜蛋白不是一般地被胞吞，而是以正常 LDL 受体的速率被内化。实验结果显示这段分选序列对于胞吞是充分的。

进一步的勘查试验中，制作了一种变异的受体用于内化检测，着重于酪氨酸残基的重要性和显示比邻的氨基酸残基的重要性。这些实验获得了两个与内化相关的序列：Tyr-X-X-ϕ 和 Asn-Phe-X-Tyr，这里 X 是任意氨基酸，ϕ 是带有庞大的疏水侧链的氨基酸。然而只有前面那个信号序列在酵母双杂交实验中显示直接与 AP-2 μ 链结合（酵母双杂交实验的细节见GNTC：4-0002）。

异亮氨酸信号介导大量受体的快速胞吞。是 AP-2 σ 链，而不是 μ 链，能够识别这些信号。然而这种相互作用并不是高特异性的，还可以涉及第二个亚单位。此外，异亮氨酸信号还介导高尔基体反面网状结构中的溶酶体蛋白分选（见 4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构）。

有些接头蛋白复合物，不是 AP 家族成员，以一种与 AP 复合物类似的形式连接一些胞吞受体到网格蛋白上。例如 β-网状内皮系统刺激剂（β- arrestin）结合到 β-肾上腺素能受体（β-adrenergic receptor）的胞质端信号和网格蛋白上，在没有 AP-2 的情况下介导受体内化。同样的，epsin 蛋白家族例如 Eps15，结合到酪氨酸蛋白激酶受体（tyrisune kinase-containing reseptor），如表皮生长因子受体（epidermal growty factor

reseptor）上，也可以起到接头蛋白的作用。

胞吞的重要特征之一是选择性，接头蛋白对此提供了一种解释。对大多数哺乳类细胞而言，大量的基本型胞吞（constitutive endocytosis）是值得重视的，每1～2h，与细胞整个质膜等量的膜就会被内化进入网格蛋白-有被小泡。而特定受体的半吸收时间（a half-time）仅仅几分钟。因此这些受体的吸收必须是选择性的。现在我们知道，当受体的胞质端特异地与接头蛋白复合物相互作用时，它们被选择性地集中到胞吞的位置，接头蛋白复合物切实地将受体连接到正在出芽的网格蛋白-有被小泡上。对比之下，不与接头蛋白相互作用的质膜蛋白就不被选择性地内化。这些蛋白质可以以低得多的速率被内化，或者被选择性地进入有被小窝的高浓度受体排挤出去。

此外，可溶性的细胞外蛋白也以低水平掺入网格蛋白-有被小泡，因为如果没有腔内容物就不可能形成小泡。由于细胞外环境大多数配体的浓度非常低，只有结合到受体才能使可观数量的配体被内化。

4.15 某些受体从早内体进入再循环，而其他受体在溶酶体中被降解

关键概念

- 早内体呈微酸性，缺乏降解酶，内化的配体能与受体分离，受体不发生降解。
- 早内体管状延伸处出芽生成运输小泡，许多受体通过运输小泡再循环到质膜表面。
- 已与受体分离的配体从早内体转移到更加酸性且富含水解酶的晚内体和溶酶体进行降解。
- 不进入再循环的受体被分开进入多泡体的小泡中，运动到晚内体和溶酶体，进行降解。
- 再循环的内体被发现位于邻近细胞核的地方，它含有一个再循环受体库，当需要时受体能迅速地转运到细胞表面。

被网格蛋白-有被小泡内化的受体、配体和胞外液体被投放进早内体，这是一群带有管状延伸部分的液泡。早内体的分布遍及细胞质外围。有被小泡在形成、切断和迅速（< 1 min）去包被后，很快投入早内体（切断和去包被的细节见4.13胞吞过程通常由网格蛋白-有被小泡介导）。束缚、停泊及脱去包被的小泡与早内体融合过程与描述过的胞吐途径惊人地相似，胞吐途径要求有Rab、系链和SNARE（见4.11 Rab GTP酶和系链是两种控制膜泡靶向运输的蛋白质）。只是这些蛋白质家族的不同成员被用在胞吞途径中。这里相对应的Rab蛋白是Rab 5，很像t-SNARE的是syntaxin 13，系链是一个长的螺旋状蛋白，名为早内体抗原（early endosomal antigen-1，EEA 1）。如图4.44所示，EEA 1结合到Rab5（和几种辅助蛋白一起）、syntaxin 13及PI3P（phosphatidylinosi-

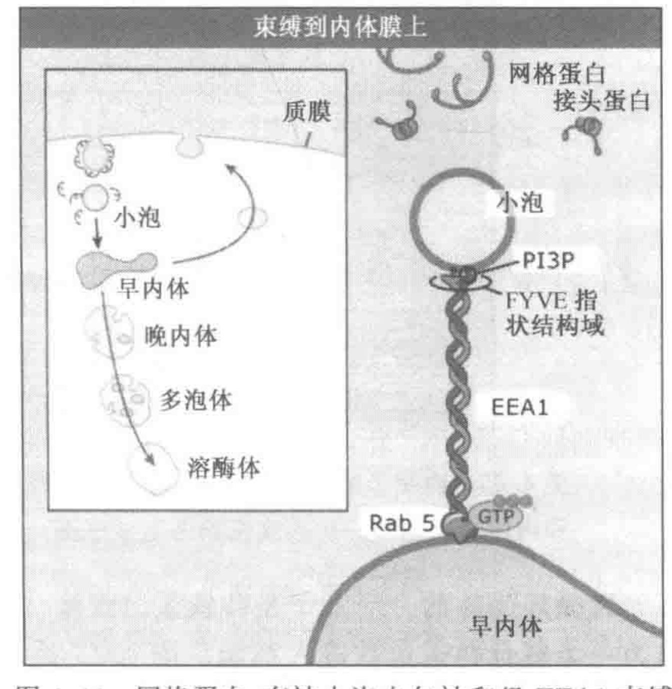


图4.44 网格蛋白-有被小泡去包被和经EEA1束缚到早内体上，EEA1与PI3P和Rab5结合。

tol-3-phosphate）上。由于这些成分在不同的膜上，EEA 1 连接这些膜并促使它们融合。

图 4.45 显示已内化的受体和它们的配体有两条主要的旅程。一条途径是内化的受体在早内体中卸掉它们的配体，此早内体腔的 pH 是 6.4～6.8。这种偏酸的 pH 触发多种配体脱离它们的受体，而受体从早内体的液泡部分伸出的管状物（tubule）部位再循环到细胞表面。脱离下来的配体不容易进入这些管状物，而是积累在早内体腔中。因为早内体比溶酶体水解酶浓度低得多而 pH 更高，它们为受体提供了相对安全的掩蔽所，使其在反复跨越胞质时减少伤害和破坏。例如营养物的受体就使用这条途径。在另一条途径中，内化的受体和配体一起运动到晚内体和溶酶体进行降解。这条途径被用于生长因子受体的下调。

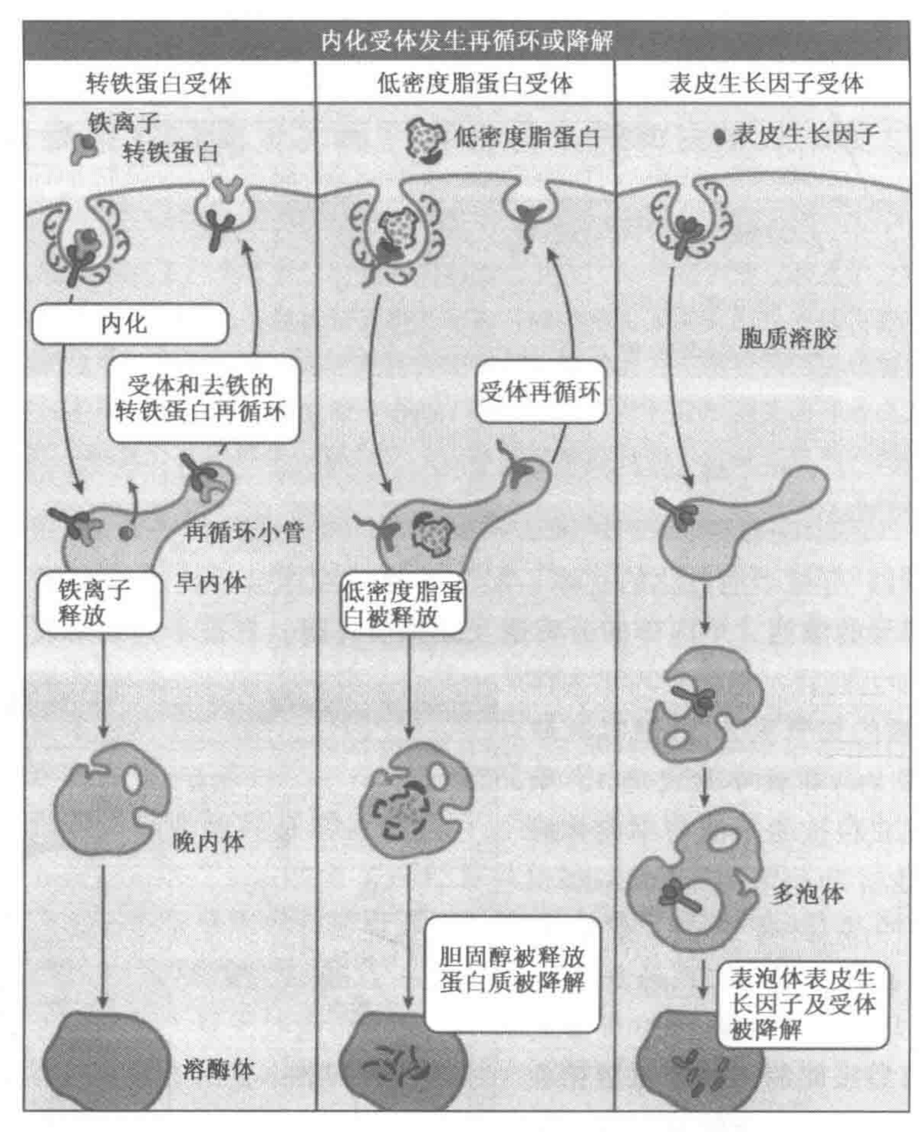


图 4.45　内化了的受体的结局。转铁蛋白受体和低密度脂蛋白（LDL）受体在质膜和内体之间循环，而表皮生长因子（EGF）受体在溶酶体中降解。

再循环受体的一个例子是转铁蛋白受体（transferrin receptor），它与转铁蛋白一起作为一个复合物运送铁进入细胞。图 4.45 显示，在早内体腔的 pH 条件下，铁从转铁蛋白上脱离下来，接着被释放进入胞质。前转铁蛋白（未结合铁的转铁蛋白）仍然与它的受体结合着，此复合物在膜泡中从内体管（endosomal tubule）被转运到细胞表面。

在细胞表面，中性 pH 触发前转铁蛋白从受体释放，从而容许受体结合另一个载有铁的转铁蛋白分子。

再循环受体的另一个例子是 LDL 受体，LDL 是血清微粒之一，运送胆固醇到细胞。LDL 与它的受体结合后被内化，释放到内体腔降解，如图 4.45 所示。受体迁徙到内体的管状延伸部位，从这些小管出芽成运输小泡使受体再循环到质膜继续物质吸收过程。转铁蛋白受体和 LDL 受体从早内体再循环到质膜，与此相对照的是，其他受体-配体复合物不再有效率地再循环，而是释放到晚内体降解。这样的受体包括受体酪氨酸激酶家族（ceptor tyrosine kinase family）的成员，例如表皮生长因子（EGF）受体和胰岛素（insulin）受体，在与它们特异的配体或激素结合之后向细胞转递分裂信息。在这样的场合，受体-配体复合物被胞吞的结果是受体降解，或者受体从细胞表面移动，致使细胞对此后暴露于配体不敏感。EGF 受体下调缺陷能导致无休止的细胞生长而成癌。图 4.45 显示，对于 EGF 和 EGF 受体，注定要降解的受体-配体复合物在膜平面上被分隔开，内化而进入内体腔。这个过程产生多泡体（multivesicular body，MVB），它是晚内体的一种类型，内部有小泡（见 4.16 早内体成熟为晚内体和溶酶体）。

通过一种固有的几何学过程，受体和脱离了它的配体在早内体中被分选。由于管状

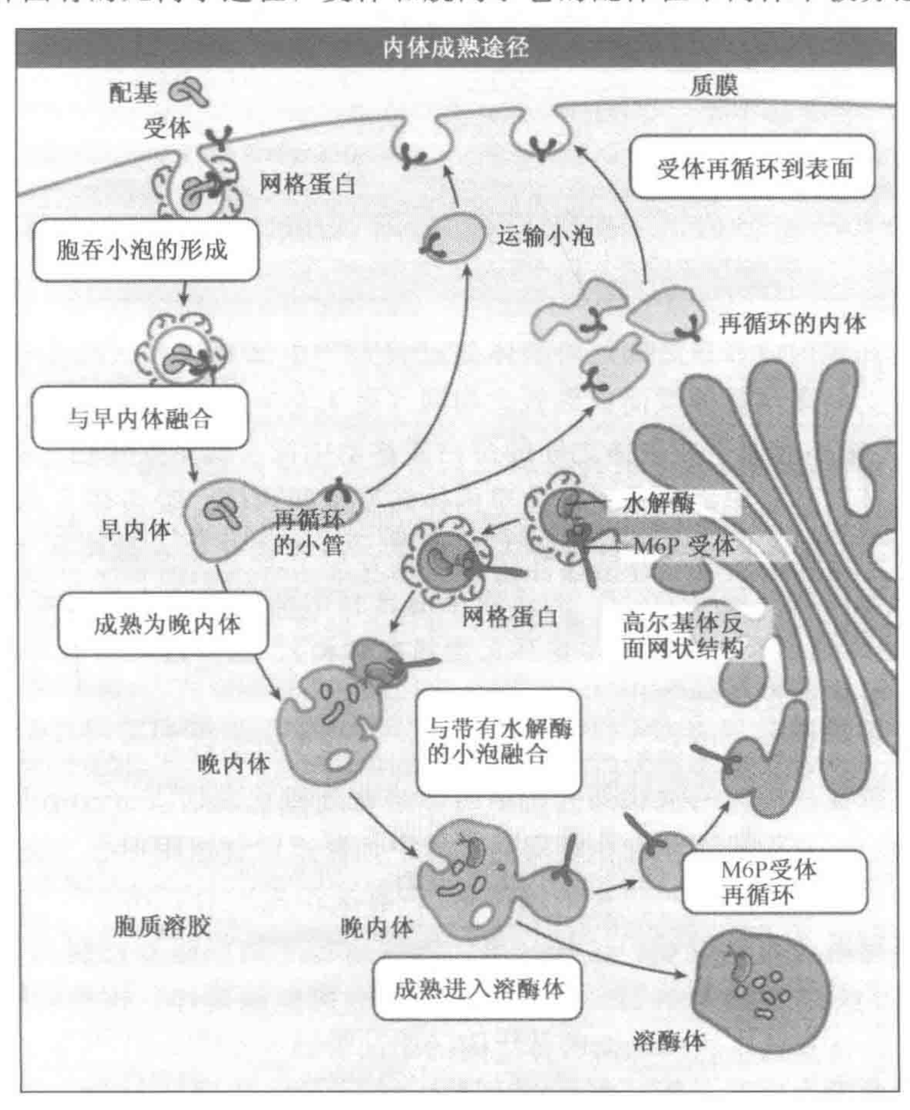


图 4.46　当早内体成熟为晚内体时，运输小泡携带组成成分到内体和使受体从内体出发进行再循环。

区域表面积与体积比率高，它占据了早内体的大部分表面面积。反之，早内体内部容积的大部分被发现是在更加呈球形的液泡区域。这样一来，受体倾向于与管状延伸区结合直接是由于这里存在着大量的膜。然而有证据指出，在与配体分离之后，受体也可以被选择性地浓集在管状部位。这些小管从早内体“掐”下生成运输小泡，它运载卸下了配体的受体返回质膜重新利用。大量的再循环运输直接而迅速地从早内体开始进行，其循环一半所需的时间仅数分钟。然而，大约 25 % 的受体被转移到一群**再循环内体（recycling endosome）**（见图 4.46），作为细胞内的库存，受体在这里能存留长达 1h。一个典型的细胞，它所有的早内体和再循环内体的膜表面积仅及质膜表面积的 25%。因为每小时 100%的质膜被内化，早内体和再循环内体的有效表面积每小时必定转换了好几次。

已从受体脱离的配体和从细胞外经非特异性内化的液体中的大分子，被大量地排除在再循环小管之外，因为小管的内部容积非常小。然而，也有一些这类物质经由起源于再循环小管的运输小泡漏出了细胞，无论如何，当早内体成熟为晚内体时，有大量的这类未分解的液体成分积累在早内体的液泡部分。

4.16 早内体成熟为晚内体和溶酶体

关键概念

- 在“成熟”过程中物质从早内体移动到晚内体和溶酶体。
- 一系列 ESCRT 蛋白复合物分选蛋白质进入膨大的伸入内体腔的小泡，形成多泡体，它促进蛋白质降解过程。

从早内体到晚内体和最后到达溶酶体的进程是一个成熟过程（展示在图 4.46 中），它至少在表象上与高尔基体顺面成熟概念相同（见 4.9 关于通过高尔基体的前行转运的两个模型）。运输小泡似乎在内体之间的蛋白质移动中没有起主要作用。取而代之的是，受体通过再循环回到质膜，失去受体使早内体转变成晚内体，晚内体含有已分离的配体如 LDL（见 4.15 某些受体从早内体进入再循环，而其他受体在溶酶体中被降解）。来自高尔基体反面网状结构（TGN）的运输小泡含有溶酶体酶，小泡与晚内体融合（见 4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构）。这一过程将晚内体转变成溶酶体，并导致已分离的配体被消化。

受体被选择性地和循序渐进地从早内体移出归因于再循环小管的形成。除此之外的所有物质仍然留在早内体的泡状部分，早内体结合到微管轨道（microtubule track）上移位到细胞中心。它们最终积聚在核周的胞质中，邻近微管组织中心。这种移动的一个原因是要限制它进一步与从质膜来的网格蛋白-有被小泡融合。与 TGN 产生的含有溶酶体成分的小泡融合可以继续，这样一来，胞吞途径上的细胞器在腔内容物如像酶和 H^+ 离子，以及膜成分如 V-ATPase 方面逐步更加类似溶酶体。这种转变是循序渐进的，产生的晚内体作为早内体和溶酶体之间的中间者。

早内体成熟的关键形态是形成**多泡体（multivesicular body，MVB）**。更晚的胞吞隔室（晚内体和溶酶体）经常具有这样的特征，即有小的膜泡状内含物，是由膜凹陷形成的（见图 4.47）。于是通常将晚内体和大多数溶酶体都归属于 MVB。在受体是酪氨酸

蛋白激酶家族情况下，这些结构的功能意义是最清楚的，比如胰岛素受体和表皮生长因子（EGF）受体，它们在配体吸收之后被降解（见 4.15 某些受体从早内体进入再循环，而其他受体在溶酶体中被降解）。

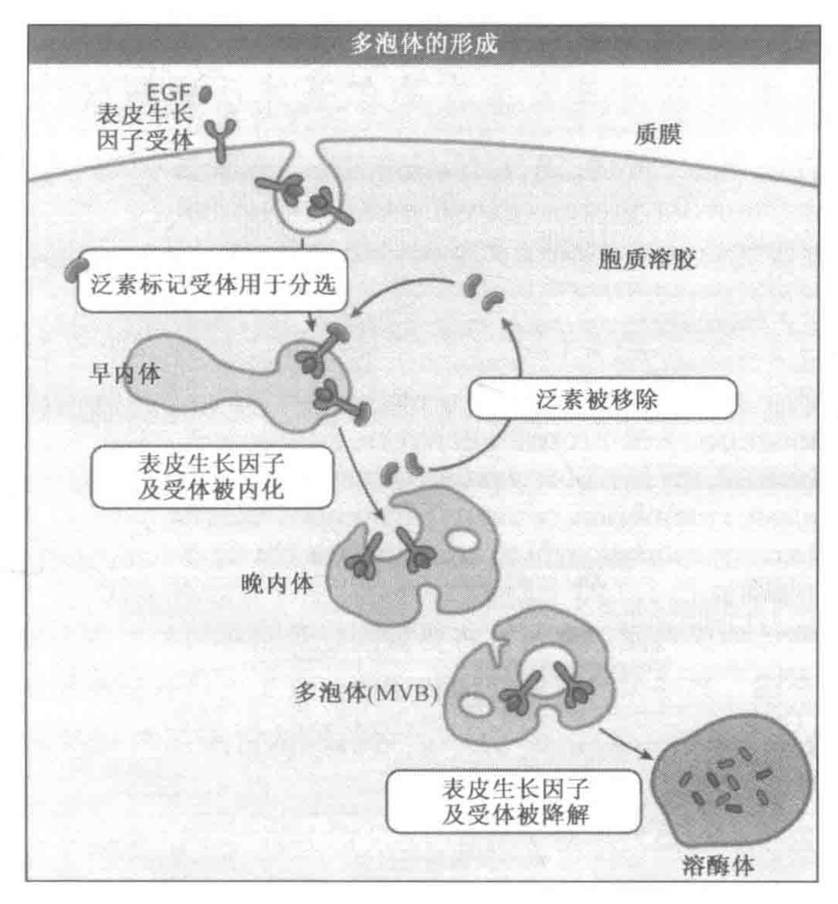


图 4.47 泛素介导的降解在多泡体中发生，多泡体属于胞吞途径中的晚内体房室。

例如 EGF 受体下调，是因为到达早内体后受体被选择性地集中到膜的某部分，然后内化进入早内体内部（见图 4.47）。这些小泡实质上与内体边界的膜性质不同，这样受体不能进入新生的再循环小管。而是同已分离的配体及其他早内体内含物一道向前被带到晚内体和溶酶体，在这里内部的小泡和它们积累的受体被脂酶（lipid-digesting enzyme）和蛋白酶降解。

对酵母 MVB 形成缺陷变异株的研究，已经揭示出 MVB 形成和控制它的膜蛋白使其被分隔在内部小泡的膜上这种机制。这个机制很可能与哺乳类中的相似。其基本原则是共价结合添加泛素（ubiquitin）到受体上作为下调标记。泛素是一种小的胞质蛋白，特殊的泛素连接酶（ubiquitin ligase）将信号泛素蛋白添加到这些受体上。胞质中的 Cb1 即是这样一个连接酶，由原癌基因编码，添加单个泛素到 EGF 受体上。Cb1 缺陷导致 EGF 受体下调缺乏，细胞不受控制地生长。有一种蛋白复合物会察觉这些单泛素化的蛋白质，在内部小泡形成时启动对它们的选择性纳入，同时也参与小泡自身的更新换代。因为这些事件在早内体水平开始，MVB 形成即反映早内体成熟为晚内体和溶酶体。从研究酵母和动物细胞中 MVB 的形成，知道有一种细胞质蛋白（Hrs）识别泛素部分，然后募集三个另外的称作 ESRT 复合物的蛋白质群。这些复合物移走泛素供再

循环利用，更重要的是驱动形成向内侵入的膜泡，它含有最初被泛素化的物质。注意到这一点是重要的，即在 MVB 产生时小泡形成的方位与所有其他目前认为的膜运输事件相反。这是因为 MVB 形成的目的是移动选中的膜成分，从普通路径转运到溶酶体以确保它们降解。

4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构

关键概念

- 所有新合成的膜蛋白和分泌性蛋白采用同样的途径抵达高尔基体反面网状结构（TGN），根据它们的目的地被分选进入不同的运输小泡。
- 网格蛋白-有被小泡转运溶酶体蛋白从高尔基体反面网状结构到正在成熟的内体。
- 在高尔基体中，甘露糖 6-磷酸与预定到溶酶体的可溶性酶共价联结，甘露糖 6-磷酸受体从高尔基体反面网状结构释放这些酶到胞吞途径。
- 溶酶体的膜蛋白从高尔基体反面网状结构转运到正在成熟的内体，但是使用不同于可溶性溶酶体酶的信号。

预定进入溶酶体的蛋白质，和所有将要到胞吐及胞吞途径上各个隔室的其他蛋白质一起，在内质网合成。溶酶体的可溶性降解酶和跨膜蛋白沿着从内质网穿过高尔基体到 TGN 的途径被转运（见图 4.4），在 TGN，它们被从限定到细胞表面和其他目的地的蛋白质中分选出来。

在哺乳类细胞中，可溶性溶酶体酶在 TGN 的分选需要一个信号，它不同于迄今讨论过的胞质分选信号。溶酶体分选信号称作甘露糖 6-磷酸（mmanose 6-phosphate，M6P）信号，在 TGN 腔内经寡聚糖修饰而来，寡糖链以共价键附着到溶酶体酶上。M6P 信号是通过分析某些溶酶体储积病（storage disease）发现的，如Ⅰ-细胞病（in-

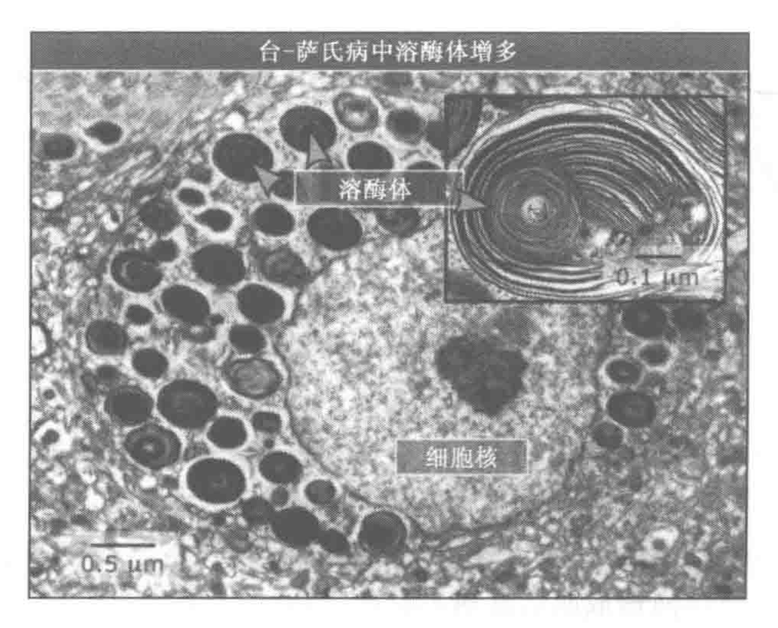


图 4.48 来自台-萨氏病人大脑的神经元。请注意有大量不正常的溶酶体，其中之一被高倍放大显示。照片经许可复制自 *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*。

clusions cell disease，也称作 mucolipidosis typeⅡ)。患者的溶酶体缺乏通常的酶，这些酶被分泌到了细胞外空间。这些溶酶体因而积蓄了未消化的物质，产生特征性的细胞内包涵物（inclusion)。类似的包涵物也在其他的溶酶体储积病中发现，如台-萨氏（Tay-Sachs）病。这种病是细胞缺乏一种氨基己糖苷酸酶（hexoseaminidase A）所致，如图 4.48 所示。

M6P 信号是 *N*-连接的甘露糖残基末端磷酸化的结果。如图 4.49 所示，*N*-乙酰氨基葡萄糖磷酸（*N*-acetylglucosamine-phosphate，GlcNAc-P）被磷酸转移酶（phosphotransferase）催化加到选定的末端甘露糖残基的碳-6-羟基基团（C-6-hydroxyl group）上。(在Ⅰ-细胞病中，由于缺乏这种磷酸转移酶，大多数溶酶体酶没有接受到 M6P 信号。）添加 GlcNAc-P 多半是发生在先前的高尔基体隔室。在 TGN 中 GlcNAc-磷酸糖苷酶（“uncovering” enzyme）随后移除 GlcNAc 残基，由此暴露 M6P 部分，分选仅发生在分选信号暴露的地方。

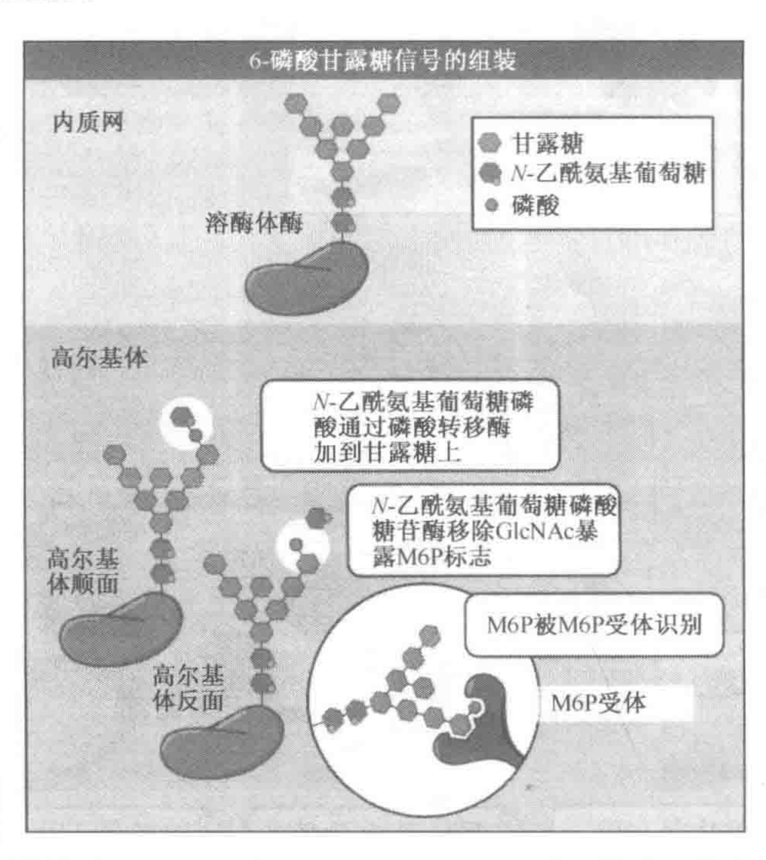


图 4.49　6-磷酸甘露糖（M6P）分选信号的组装。附着在溶酶体酶上的高甘露糖寡糖链在高尔基体最先的扁囊部位被修饰，即添加 *N*-乙酰氨基葡萄糖磷酸（GlcNAc-P)。在高尔基体靠后的扁囊中 *N*-乙酰氨基葡萄糖残基被除去，暴露出 M6P 部位，被受体识别。

诚然，在胞吐途径上许多蛋白质含有高甘露糖寡糖链（high-mannose oligosaccharide)，它们并不是溶酶体酶，这样 M6P 分选信号的产生就必须要求只发生在溶酶体酶序列处的其他信息。在如同许多其他分选信号那样的直线氨基酸序列中，这个信息没有被发现，信息是存在于溶酶体酶的非邻接部分（noncontiguous part）形成的“斑”(patch）中。在修饰酶结合的寡糖链之前，磷酸转移酶必须首先识别“斑”。

M6P 分选信号被 M6P 受体识别（受体有两种类型)，M6P 受体最初位于 TGN 中。两种 M6P 受体的胞质端都含有靶向运输到内体的分选信号。一种分选信号是酪氨酸型

的（tyrosine-based），可以被 TGN 处的 AP-1 网格蛋白接头蛋白复合物识别（接头蛋白的细节见 4.14 接头蛋白复合物连接网格蛋白和跨膜的待运蛋白）。

在 M6P 受体胞质端的另一个分选信号是置于酸性簇群中的异亮氨酸信号。这个信号有别于介导从细胞表面内化和与 GGA 蛋白相互作用的异亮氨酸型信号，如图 4.50 所示。GGA 是一个蛋白家族，之所以如此命名是因为它们局限于高尔基体，含有与 γ-接头蛋白的附属区域同源的序列，以及与 ADP-核糖基化（ADP- ribosylation）因子结合。GGA 被认为是高效率的打包分子（packaging molecule），帮助装载 M6P 受体，使其与溶酶体酶结合，进入从 TGN 出芽的网格蛋白-有被小泡。GGA 似乎是将 M6P 受体和网格蛋白移交给新生小泡上的 AP-1。

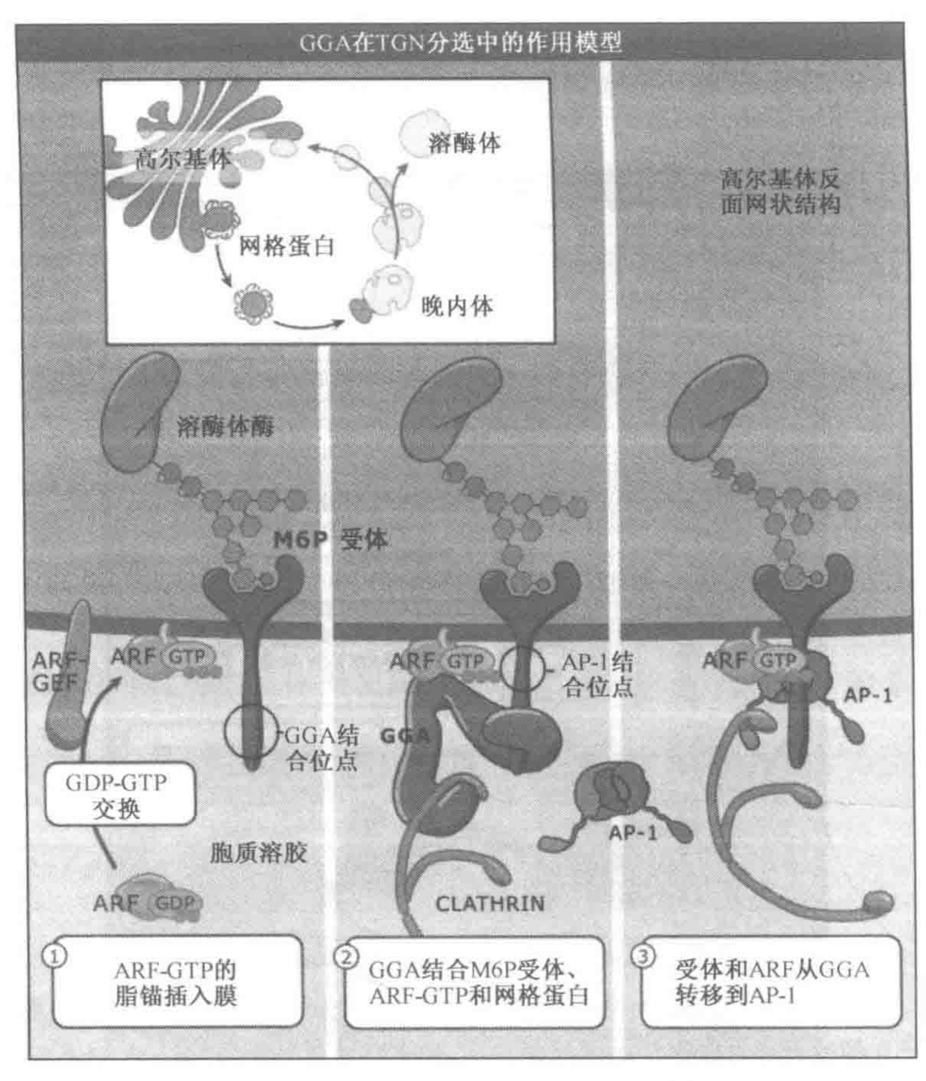


图 4.50　当网格蛋白-有被小泡在高尔基体反面网状结构（TGN）形成时，GGA 可以转移 M6P 受体和网格蛋白到 AP-1 接头蛋白复合物。

图 4.51 中，TGN 产生的网格蛋白-有被小泡可能靶向运动到了晚内体，在那里 M6P 受体和它结合的酶分离，与胞吞的受体-配体复合物相似。酶也能通过从 TGN 经细胞表面这一次级的路线投放到早内体。内体比 TGN 更具酸性，酸性 pH 引发酶与 M6P 受体分离，允许酶自由地在内体腔中积累。然后 M6P 受体从内体再循环到 TGN，继续酶运输的行程。再循环过程使用不同的接头分子 TIP47，它识别另一个位于 M6P 受体胞质端的分选信号（苯丙氨酸/色氨酸或疏水残基信号）。TIP47 并不像其他已知的

接头蛋白分子那样，募集 Rab9 到新生的小泡来使 M6P 受体再循环到 TGN。Rab9 涉及这些小泡的靶向运输步骤。

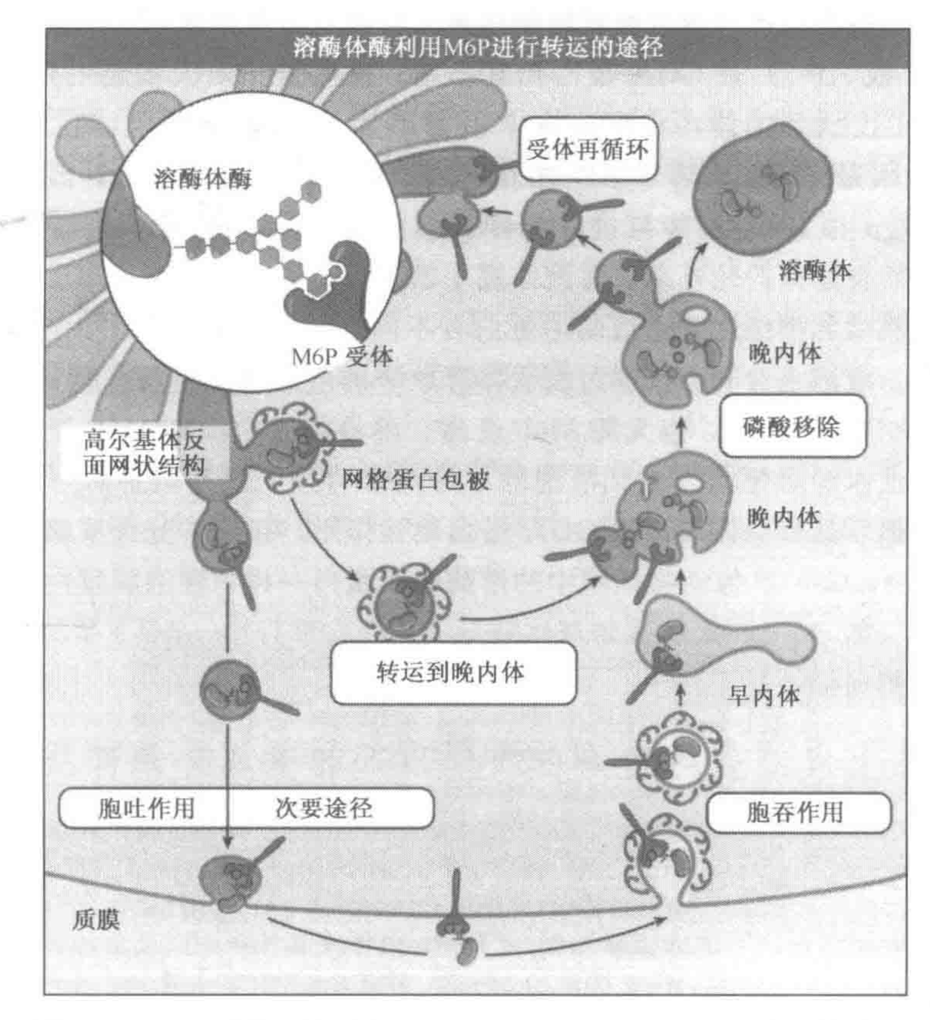


图 4.51　M6P 分选信号被用于溶酶体酶从 TGN 到胞吞途径的转运。主要的途径是直接从 TGN 到晚内体。也有经过细胞表面的次要途径。

可溶性溶酶体酶经由胞吐途径释放到内体，是酶正常成熟过程的要素。在胞吞途径中，溶酶体酶避免降解蛋白质，直到到达它们的最终目的地。至少有三种机制来保障酶只在正确的隔室有活性：

• 在内质网和高尔基体的 pH 条件下溶酶体酶失活，仅在内体和溶酶体的酸性 pH 下活化。这样，内体的酸性 pH 不仅促使它们与 M6P 受体分离，还是酶活化的基础。

• 有些溶酶体酶在内质网合成时是酶原形式，它含有 N 端短肽序列，能抑制酶的活性直到该短肽在内体中被裂解（cleave）。许多这样的裂解是“自催化的”（autocatalytic），意思是给定的蛋白酶在到达 pH 充分低的细胞器时活化自身。

• 某些已经活化的酶是磷酸酶，它裂解 M6P 分选信号。移除这个信号，防止与再循环的 M6P 受体结合，有助于限制有活性的溶酶体酶逃逸到 TGN。

所有这些成熟事件开始于晚内体水平，当酶进入胞吞途径时。随后的酶向溶酶体移动增进了这些事件的加速和效率。这里存在一个从早内体（pH6.5～6.8）通向溶酶体（pH4.5～5.0）的 pH 递减梯度。由于大多数溶酶体酶在 pH<5 时显示出最佳酶活力，越是进一步深入胞吞途径，它们越是变得更有活力。

驻留的溶酶体膜蛋白，如溶酶体糖蛋白（lgp）和溶酶体联结膜蛋白（lysosomal-associated membrane protein，lamp），通过 M6P 非依赖机制从 TGN 开始靶向运输。这些蛋白质在它们的胞质区域含有酪氨酸的信号，它指定该蛋白质与一个或更多接头蛋白复合物（AP-1 或 AP-3）或 GGA 蛋白相互作用。这些蛋白质大概经由网格蛋白-有被小泡被从 TGN 投放到内体，在溶酶体中积累。与 M6P 受体不同，它们不再循环到 TGN，或许是因为它们缺乏与 TIP47 相互作用的能力。虽然大多数其他膜蛋白将在溶酶体中降解，lgp 和 lamp 却能抵抗溶酶体的蛋白水解。Lgp/lamp 蛋白是高度糖基化的，据认为，糖类是保护性外被，溶酶体膜中糖蛋白密集，这二者都赋予其抗降解性。

酵母细胞和哺乳类细胞分选溶酶体蛋白有不同的要求。在酵母中，液泡（vacuole）与溶酶体相当。液泡也含有一批通过膜受体释放来的可溶性水解酶。但是从 TGN 转运到液泡没有 M6P 识别标志，也无需 M6P 受体，酵母细胞中没有 M6P 受体的准确对应物。介导可溶性水解酶靶向运输到液泡的信号尚未可知，但是似乎酶与一种膜受体结合。基因证据提示这种受体可以跟 GGA 蛋白相互作用，指出了分选策略的一种综合性的保留（conservation）。像动物细胞中的溶酶体膜蛋白一样，液泡膜蛋白似乎依靠网格蛋白接头蛋白（如 AP-3）来从高尔基体转运。然而在酵母中，AP-3 是与异亮氨酸而不是与酪氨酸型靶向信号相互作用。

4.18 极性上皮细胞运输蛋白质到顶部和基底外侧部质膜

关键概念

- **极性细胞的质膜有分开的区域，拥有各自的一批蛋白质，所以需要进一步的分选步骤。**
- **极性细胞表面蛋白的分选能够发生在 TGN、内体或者质膜的一个区域，这取决于细胞类型。**
- **极性细胞中的分选由特定的接头蛋白复合物，或许还有大量的脂和肌动蛋白介导。**

在多细胞有机体中，大多数类型细胞的质膜由多个区域组成，在连续的脂双层中分布着生物化学上、结构上、功能上独特的区域。这样的细胞被认为是“具有极性的”（polarized）。最好的例子是上皮细胞和神经细胞。上皮细胞衬在整个身体的体腔中（例如肠、肾、气管），它拥有两个性质不同的表面。顶端区域（apical domain）面向器官的腔，基底外侧区域（basolateral domain）面向血流或相邻的细胞（见图 4.15）。

在特化的吸收营养物质的上皮细胞中（例如肠道上皮细胞），顶端区域有特征性的细小外褶（outfolding），叫做微绒毛（microvilli），以增加细胞表面积利于吸收。这种上皮细胞的顶端质膜（apical plasma membrane）有丰富的膜蛋白，促进营养物质如氨基酸、糖类及其他分子的摄取。顶端质膜也富含一批独有的膜糖脂。

相比之下，基底外侧区域含有存在于非极性细胞质膜中的大多数膜蛋白（例如 LDL 受体、EGF 受体）和脂类。此外，基底外侧区域中的转运体（transporter）携带营养物质离开细胞进入血浆。

连接复合体（junctional complex）——包括紧密连接（tight junction）、黏着连接（adherent junction）、桥粒（desmosome）——分开了顶端和基底外侧区域（见 15.16 紧密连接形成了细胞间的选择性渗透屏障）。这些复合体的功能之一是防止顶端的膜成

分侧向扩散到基底外侧区域，并钳住细胞侧面。因此，脂和蛋白质必须被定向到正确的区域。在分泌和胞吞途径中，运输是有极性的，以保障顶膜（apical membrane）和基底外侧膜的成分被靶向运输到恰当的目的地。向基底外侧区域转运所依赖的靶向信号不同于向顶端区转运的信号。

新合成的膜蛋白在高尔基体反面网状结构（TGN）被分选进入各类不同的出芽小泡，这取决于它们究竟是要被释放到顶端面还是基底外侧面，如图 4.52 所示。对许多极性上皮细胞而言，基底外侧面的转运理解得比较深入。大多数基底外侧面蛋白在它们的胞质区域有酪氨酸型或异亮氨酸型信号，在与蛋白被胞吞或靶向运送到溶酶体相似的过程中，被接头蛋白复合物识别（见 4.14 接头蛋白复合物连接网格蛋白和跨膜的待运蛋白）。在 TGN，酪氨酸型信号和某些非酪氨酸型信号被 AP-1B 识别，AP-1B 是上皮细胞特异的网格蛋白 AP-1 复合物的异构体（isoform）。AP-1B 与网格蛋白配对起作用，产生指向基底外侧面的运输小泡。AP-1B 复合物仅仅是它的 μ 链不同于广泛分布的 AP-1A 复合物。μ1A 和 μ1B 亚单位近 80 % 相同，但是它们结合不同类型的信号。这一差异的结构基础尚未阐明。

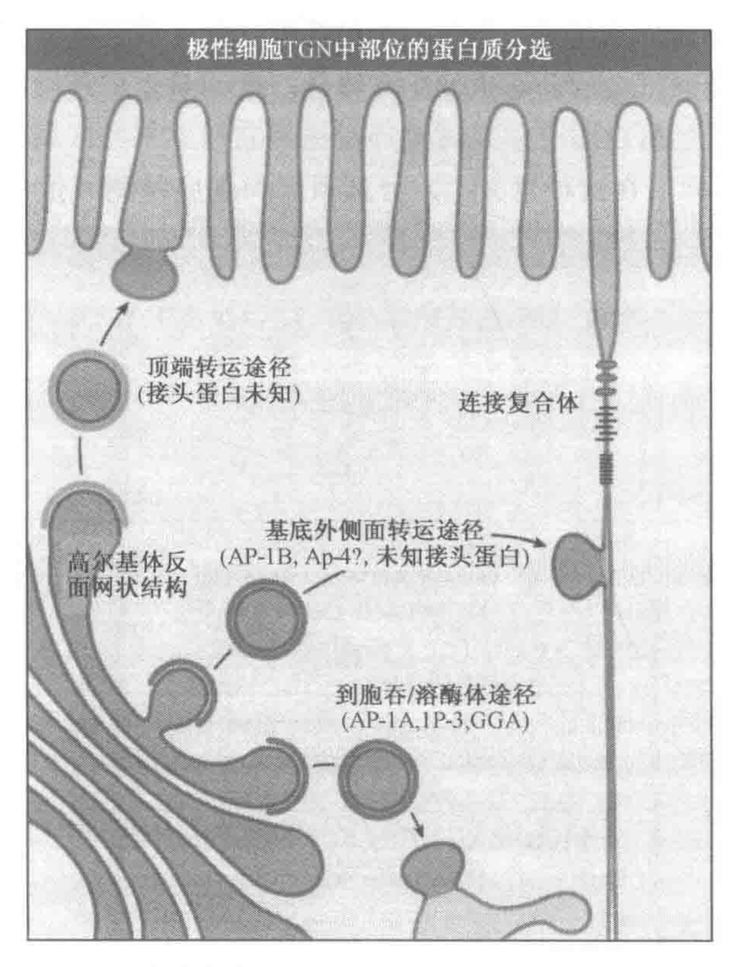


图 4.52　发生在极性上皮细胞 TGN 部位的三类分选事件。蛋白质被分选进入胞吞途径和到细胞的顶膜及基底侧面膜。每一条途径使用不同的接头蛋白复合物。

预定要定位到顶端质膜的蛋白质没有特定的胞质区域信号，而是在它们位于内腔的区域含有关键性的 *N*- 或 *O*- 连接糖基，或者有特别的膜锚定区（membrane anchoring

domain)，有利于它们包入定向到顶端的运输小泡中。膜锚定的一个例子是 GPI 锚(anchor)，在内质网中它添加到一定的蛋白质上（见 3.13 脂性 GPI 添加到某些易位后的蛋白质上）。这样的顶端靶向小泡（apically targeted vesicle）经常含有独特的脂类区域，称作脂筏（lipid raft），它蓄积顶端的蛋白质，以供选择、包入到顶端的膜泡中(见图 4.52)。可以推测，这一机制也允许脂类一定程度地参加，以至复合物糖脂出现在上皮细胞的顶端面而不是基底外侧面，并且也被包入这些膜泡。

第三种类型的极性靶向运输（polarized targeting）见于某些膜蛋白，它们可能没有靶向信息，被装在通向顶端和基底外侧的膜泡中运出 TGN。然而，在释放到任一种质膜之后，这些蛋白质还是能够成为有极性的。这要经过一个叫做区域特异性固位（domain-specific retention）的过程，其间，膜蛋白与一种细胞骨架构成的支架相互作用，这种支架事先已经具有极性。支架含有对诸如细胞之间接触这类信号起反应的蛋白质。通常这种支架在连接复合物部位组装，这就允许膜蛋白不对称地聚集（连接复合物的细节见 15.16 紧密连接形成了细胞间的选择性渗透屏障）。与支架相互作用的膜蛋白被稳定在适当的膜区域。那些被投放到缺乏这种支架的区域的蛋白质则被胞吞而内化，或在溶酶体中降解，或再循环从而被给与另一个机会到达适合的、有支架的区域。

顶端和基底外侧面蛋白的分选也发生在内体。因为从上皮细胞的顶端和基底外侧面发生胞吞时，内化了的蛋白质必须在再循环时送回它们原来的区域。内体，也许是早内体，能够像 TGN 那样（在这种意义上）分选顶端和基底外侧面蛋白进入各自的再循环

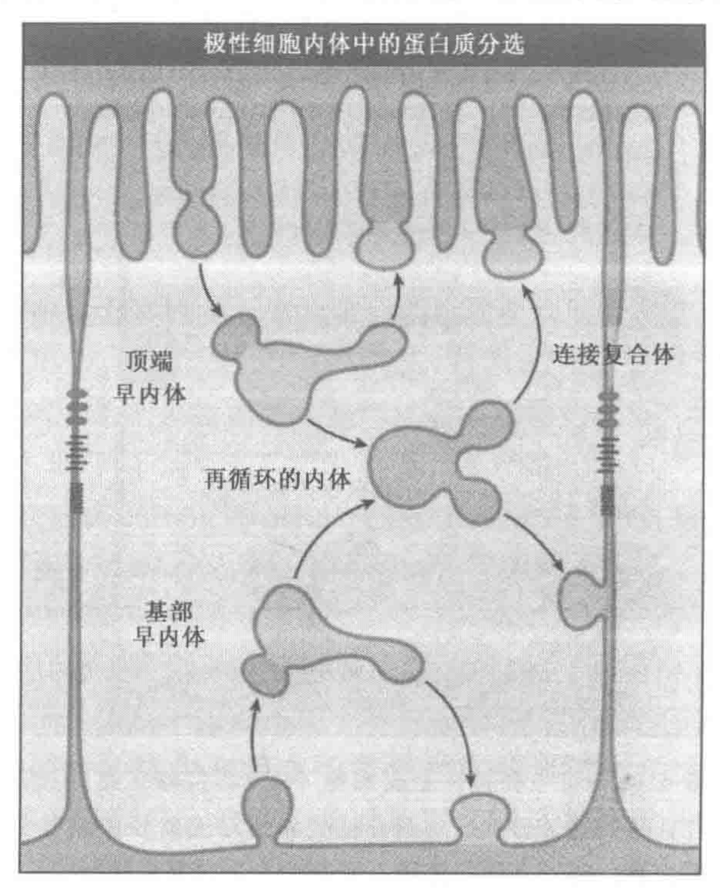


图 4.53　从细胞顶端或基底侧面膜内化的分子，能够直接从早内体再循环到它们原先所在的膜区域，或经由再循环的内体分选到不同的膜区域。

小泡，它们将分别靶向运动到顶端和基底外侧面膜，如图 4.53 所示。实际上，内体中有极性的分选使用了和 TGN 中同样的信号。为了使上皮细胞维持其连续胞吞面质膜的极性，来自内体的极性再循环是必不可少的。事实上，甚至生物合成性分选（biosynthetic sorting）看来也发生在内体中，特别是再循环的内体。这样，从 TGN 到基底外侧面质膜这条途径可以用再循环的内体作为中介物，这也许解释了为什么同一批信号被用于两条途径。

4.19 某些细胞储存蛋白质用于分泌

关键概念

- 某些荷载（cargo）分子被分选进分泌颗粒，分泌颗粒与质膜融合，仅在有刺激时释放它们的内含物。
- 调节型分泌的蛋白质储存通常涉及浓缩过程，蛋白质分子自联结、浓缩，形成一个压缩的小包，最终释放到细胞外。
- 调节型分泌的蛋白质浓缩开始于内质网，在高尔基体中继续，在浓缩泡（condensing vacuole）中完成。浓缩泡最后形成分泌颗粒。
- 在所有的胞吐阶段，浓缩过程伴随着选择性的膜回收。
- 突触小泡与质膜融合必须有 SNARE 蛋白参加，但是受网格蛋白-敏感蛋白如 synaptotagmin 调节。

许多真核细胞能在细胞内的囊泡中储存分泌性蛋白，以便当细胞被适当的信号（secretagogue，催分泌剂）刺激时将蛋白质释放到细胞外空间。这个过程被认为是调节型分泌（regulated secretion），它提供了迅速地释放大量物质的方法，避免了物质从头合成所造成的延迟。种类繁多的蛋白质，从神经递质到激素和消化酶都能以这种方式储存。储存泡被命名为**分泌颗粒（secretory granule）**，它起源于 TGN，伴随着一种成熟过程。

对调节型分泌的细节最初的研究是用胰腺细胞做的，胰腺细胞合成分泌性蛋白（大多数是胃和小肠中的消化酶），其量之大，甚至占了这些细胞制造的蛋白质的大多数（见 4.2 胞吐途径概述）。如图 4.54 说明的，分泌性蛋白的包装在分泌途径早期，蛋白质从内质网出来后即开始。这些蛋白质不像是有输出信号（export signal），它们在内质网中的浓度与正在出芽和已经出芽的 COPⅡ小泡中的一样。在 COPⅡ小泡融合形成泡管群（VTC）后，COPⅠ小泡开始了回收过程，但是它们以某种方式从正在出芽的 COPⅠ小泡中排除了分泌性蛋白。结果分泌性蛋白在 VTC 中的浓度增加了。“排除”可能是分泌性蛋白的“集合性质”（colligative property）引起的，这种性质使它们彼此联结，排斥其他类型的蛋白质。这些蛋白复合物可能太大不能进入逆行的 COPⅠ小泡。

浓缩过程在高尔基体继续进行，最后蛋白质进入从 TGN 出芽的浓缩泡。由它形成的分泌颗粒显著地大小均一（直径约 0.5 μm），在细胞内靠近顶膜（apical membrane）的地方它们占据着独有的区段，一旦细胞被催分泌剂（secretagogue）刺激，分泌颗粒最终与顶膜融合（见图 4.7）。在外分泌胰腺的情况下，有一种这样的催分泌剂叫做 CCK，是食物吸收时胃释放的一种肽。通过刺激胰腺释放分泌颗粒，CCK 使消化酶得以释放到胃肠道中。

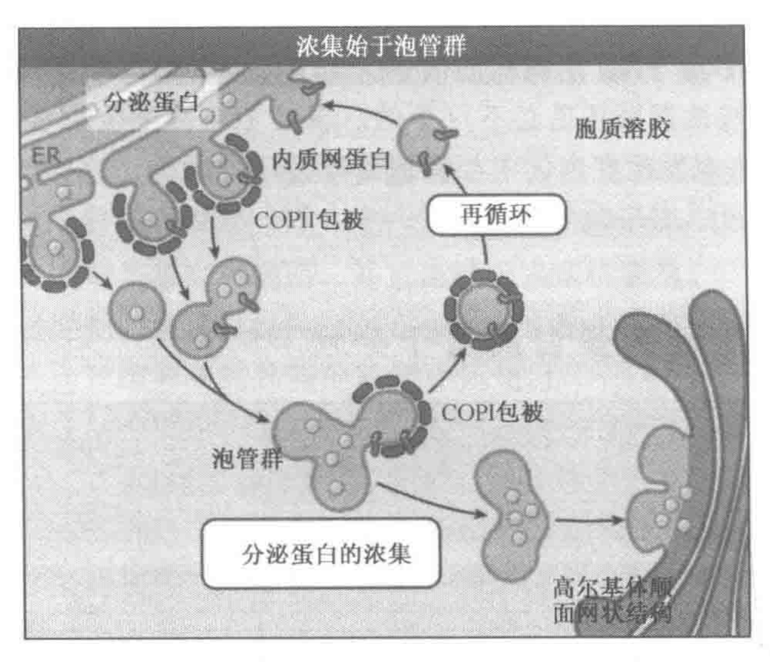


图 4.54 在泡管群中，当其他蛋白质被移进 COPⅠ有被小泡时，将要通过调节型分泌从细胞释放的蛋白质在此浓集。

在 PC12 细胞中对分泌颗粒的成熟作了研究，PC12 是来自肾上腺的神经内分泌细胞系，对神经生长因子起反应而分泌激素。如图 4.55 所示，浓缩泡从 TGN 出芽，然后进一步浓缩成熟，在最后形成的分泌颗粒中没有发现膜成分被移走。这些成分是通过从颗粒表面生成的网格蛋白-有被小泡被移走的。有被小泡能收回 TGN 蛋白，如 furin 和 M6P 受体，它们是不经意地被加进了出芽颗粒的膜中的。

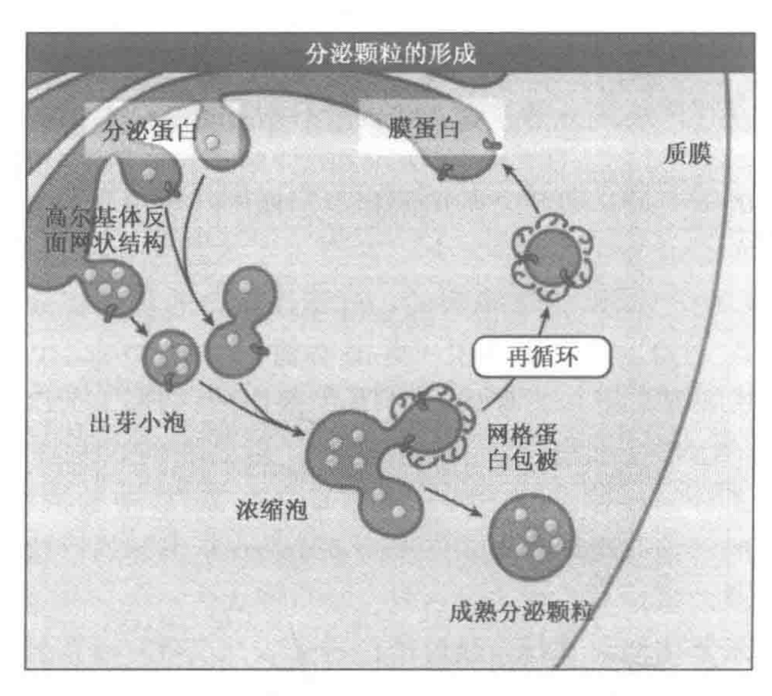


图 4.55 调节型分泌蛋白被包装进从 TGN 出芽的小泡，彼此融合。分泌性内含物浓缩使得有了多余的膜，这些膜通过网格蛋白有被小泡再循环。一旦恰当的刺激被细胞接受，成熟颗粒仅与质膜融合。

分泌颗粒与质膜可调节的融合使用了与基本型分泌过程同样的基本机制。主要的区别是前者的融合在 SNARE 装配的场所被阻断。融合要求一个信号，它是由来自细胞外环境的钙离子流介导的。如图 4.56 所示，一种钙结合蛋白 synaptotagmin，在这一调节过程中起着关键的作用。

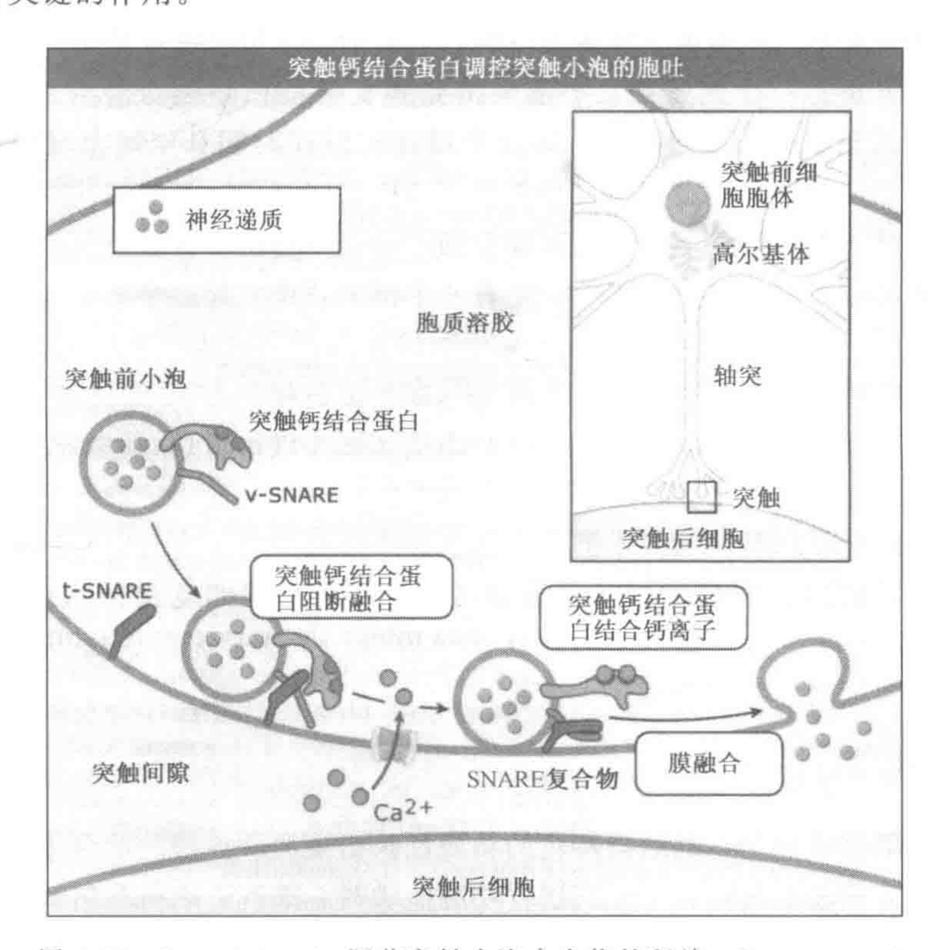


图 4.56　Synaptotagmin 调节突触小泡内含物的释放。Synaptotagmin 被认为与由 v-SNARE 和 t- SNARE 形成的复合物结合，因此可防止膜融合。通过钙通道进入的钙离子结合到 Synaptotagmin 上，后者释放 SNARE 复合物，使膜得以融合。

Synaptotagmin 首次被鉴定为突触小泡的一种膜成分，突触小泡是一种特殊的分泌颗粒，介导神经末梢释放神经递质。神经元是极性细胞，包括两个不同的区域，一个是细胞体，一个是轴突，它们并没有被可见的连结分开（见图 4.56）。轴突延伸得很长(有些长达数米)，它传递电脉冲由一个神经细胞到下一个细胞。轴突末端与肌细胞或其他神经细胞的胞体（或细胞体的叫做树突的突起）形成一种独特的联结形式，这就是突触（synapse）。轴突及突触的质膜有高度特化的适合神经传导功能的生化组成。Synaptotagmin 参与神经细胞和非神经细胞的调节型分泌过程。

Synaptotagmin 的末端有一个膜锚，其余的蛋白质伸进细胞质。这个细胞质区域包含两个网格蛋白结合部位，可与一切 SNARE 蛋白形成一个复合物，这被认为能使它们保持非活性构型，如图 4.56 所示。使质膜电位去极化的神经冲动触发钙离子通过突触前膜的钙通道涌入，引起局部钙浓度增加，这被认为是改变 synaptotagmin 构象的信号。Synaptotagmin 构象改变使其脱离 SNARE 复合物，这样 SNARE 复合物即介导突

触小泡与突触前膜融合。

4.20 展望

有许多，也许是多数作为膜运输装置的蛋白质已经被鉴定出来，在某些实例中它们行使的功能已被阐明。然而也有许多蛋白质，它们的功能仅仅能被猜测，迫切需要更高程度的澄清和分析。一个例子是，小泡束缚到膜上目前被估量为全或无事件（all-or-none event），这里忽略了一个事实，即这个过程可以在时间和空间上被高度地人为安排。生物化学和显微镜的鉴定似乎只是提供了分析这些过程所需要的检测。

进一步说，需要将这些不同的过程整合到一起。单独的步骤通常能被辨别，但是它们配合在一起的方式则经常是难解的。还有一个例子是极性细胞中要运送到基底外侧部膜的物质的选择。这里很清楚，需要一个特别的接头蛋白（AP-1B），但它是怎样跟包被装配过程联结的？与基底外侧面物质结合的接头蛋白和与M6P受体结合的接头蛋白，两者都结合网格蛋白但是目的地不同。怎样防止这两类接头蛋白-荷载物（cargo）复合物进入同样的运输小泡？是什么在调节细胞或组织代谢发展变化中的各个膜运输事件使它们有序？生物化学和显微镜技术似乎将使这些事件再次得到实时的观察和分析。

另一方面，运用X射线和核磁共振方法，使越来越多的复合物结构正在被解析。最近是AP-2接头蛋白复合物的结构。这些结构提供了非常需要的对可能的机制的洞察，然后能用基因和生物化学方法去试验。

4.21 总结

在胞吐和胞吞途径上，细胞器特化的功能反映出蛋白质独特的混合状态。尽管在生物合成后蛋白流通过细胞器，当它们进行功能活动时，细胞器独有的组成必须维持。小泡在膜之间的穿梭运输解决了在连续变化面保持隔室身份的问题。蛋白质选择性地掺入小泡，小泡携带它们到下一个隔室，然后与这个隔室融合。

蛋白质被选择时使用分选信号（sorting signal），信号直接或间接地结合到小泡的包被蛋白（coat protain）上。这一机制在胞吞途径上特别普遍，但在胞吐途径上是如此地少，那里的许多被运输的分子，尤其是那些大量合成的或者大结构的分子，被批量运输（bulk flow）穿过胞吐途径到达高尔基体反面网状结构（TGN）。直接选择的缺如迫使两个其他类型的信号承担起蛋白质的保留和回收任务。第一个信号将蛋白质集中到胞吐膜的特定部位，其机制涉及跨膜区域。第二个信号回收逃逸蛋白，把它们送回平常进行功能活动的细胞器。许多可溶性蛋白和大量内质网蛋白的C端有KDEL信号，用于从早高尔基隔室回收。内质网膜蛋白有二碱式回收信号（dibasic signal）

小泡到正确隔室的靶向运输（targeting）需要Rab GTPase、膜系链和SNARE蛋白。同一性质的SNARE相互作用，将膜带到一起，最终融合。这最后的融合行动可受控制，以实现从消化酶到神经递质这类物质的调节型分泌（regulated secretion）。

参考文献

4.1 导言

综述

Mellman, I., and Warren, G., 2000. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* v. 100 p. 99–112.

4.2 胞吐途径概述

综述

Griffiths, G., and Simons, K., 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* v. 234 p. 438–443.

Helenius, A., and Aebi, M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* v. 291 p. 2364–2369.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* v. 54 p. 631–664.

Palade, G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* v. 189 p. 347–358.

Pfeffer, S., 2003. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* v. 112 p. 507–517.

Rothman, J. E., 1981. The Golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science* v. 213 p. 1212–1219.

Rothman, J. E. and Wieland, F. T., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* v. 272 p. 227–234.

Van den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A., and Opdenakker, G., 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* v. 33 p. 151–208.

研究

Hang, H. C., and Bertozzi, C. R., 2005. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg. Med. Chem.* v. 13 p. 5021–5034.

Novick, P., Ferro, S., and Schekman, R., 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* v. 25 p. 461–469.

4.3 胞吞途径概述

综述

Aderem, A., and Underhill, D. M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* v. 17 p. 593–623.

Conner, S. D. and Schmid, S. L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* v. 422 p. 37–44.

Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S., 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* v. 279 p. 679–685.

Greenberg, S., and Grinstein, S., 2002. Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* v. 14 p. 136–145.

Mellman, I., 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 12 p. 575–625.

Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A., 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* v. 55 p. 663–700.

Rojas, R., and Apodaca, G., 2002. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 944–955.

Stevens, T. H. and Forgac, M., 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H+)-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 779–808.

Trombetta, E. S., and Mellman, I., 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* v. 23 p. 975–1028.

Tuma, P. L., and Hubbard, A. L., 2003. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* v. 83 p. 871–932.

研究

Fuchs, R., Schmid, S., and Mellman, I., 1989. A possible role for Na+,K+-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 86 p. 539–543.

Galloway, C. J., Dean, G. E., Marsh, M., Rudnick, G., and Mellman, I., 1983. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 80 p. 3334–3338.

4.4 膜泡介导的蛋白质运输的概念

综述

Rothman, J. E., 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* v. 372 p. 55–68.

Springer, S., Spang, A., and Schekman, R., 1999. A primer on vesicle budding. *Cell* v. 97 p. 145–148.

Waters, M. G., and Hughson, F. M., 2000. Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* v. 1 p. 588–597.

4.5 信号介导的蛋白质运输和批量蛋白质运输概念

综述

Pfeffer, S. R., and Rothman, J. E., 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* v. 56 p. 829–852.

Rothman, J. E., and Wieland, F. T., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* v. 272 p. 227–234.

研究

Bretscher, M. S., Thomson, J. N., and Pearse, B. M., 1980. Coated pits act as molecular filters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 77 p. 4156–4159.

Wiedmann, M., Huth, A., and Rapoport, T. A., 1984. Xenopus oocytes can secrete bacterial beta-lactamase. *Nature* v. 309 p. 637–639.

Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. A., and Rothman, J. E., 1987. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* v. 50 p. 289–300.

4.6 COP II-有被小泡介导从内质网到高尔基体的运输

综述

Barlowe, C., 2003. Molecular recognition of cargo by the COPII complex: a most accommodating coat. *Cell* v. 114 p. 395–397.

Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H., and Appenzeller, C., 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* v. 113 (Pt 4) p. 587–596.

Springer, S., Spang, A., and Schekman, R., 1999. A primer on vesicle budding. *Cell* v. 97 p. 145–148.

Warren, G. and Mellman, I., 1999. Bulk flow redux? *Cell* v. 98 p. 125–127.

研究

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R., 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 77 p. 895–907.

Belden, W. J. and Barlowe, C., 2001. Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* v. 294 p. 1528–1531.

Bi, X., Corpina, R. A., and Goldberg, J., 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* v. 419 p. 271–277.

Kuehn, M. J., Schekman, R., and Ljungdahl, P. O., 1996. Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles *in vitro*. *J. Cell Biol.* v. 135 p. 585–595.

Nichols, W. C. et al., 1998. Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* v. 93 p. 61–70.

Nishimura, N., Bannykh, S., Slabough, S., Matteson, J., Altschuler, Y., Hahn, K., and Balch, W. E., 1999. A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 15937–15946.

Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J. M., and Lippincott-Schwartz, J., 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* v. 389 p. 81–85.

Springer, S., and Schekman, R., 1998. Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* v. 281 p. 698–700.

4.7 从内质网逃逸的驻留蛋白被回收

研究

Munro, S., and Pelham, H. R., 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* v. 48 p. 899–907.

Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P. A., 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 58 p. 707–718.

Schindler, R., Itin, C., Zerial, M., Lottspeich, F., and Hauri, H. P., 1993. ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur. J. Cell Biol.* v. 61 p. 1–9.

Schutze, M. P., Peterson, P. A., and Jackson, M. R., 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* v. 13 p. 1696–1705.

Wilson, D. W., Lewis, M. J., and Pelham, H. R., 1993. pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*. *J. Biol. Chem.* v. 268 p. 7465–7468.

4.8 COP I-有被小泡介导从高尔基体到内质网的逆行转运

综述

Pelham, H. R., 1994. About turn for the COPs? *Cell* v. 79 p. 1125–1127.

研究

Aoe, T., Huber, I., Vasudevan, C., Watkins, S. C., Romero, G., Cassel, D., and Hsu, V. W., 1999. The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 20545–20549.

Donaldson, J. G., Lippincott-Schwartz, J., Bloom, G. S., Kreis, T. E., and Klausner, R. D., 1990. Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 2295–2306.

Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Démollière, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H., and Cosson, P., 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 79 p. 1199–1207.

Nickel, W., Brugger, B., and Wieland, F. T., 2002.

Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding *J. Cell Sci.* v. 115 p. 3235–3240.
Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., and Rothman, J. E., 1991. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* v. 67 p. 239–253.
Waters, M. G., Serafini, T., and Rothman, J. E., 1991. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* v. 349 p. 248–251.

4.9 关于通过高尔基体的前行转运的两个模型

综述

Pelham, H. R., and Rothman, J. E., 2000. The debate about transport in the Golgi—two sides of the same coin? *Cell* v. 102 p. 713–719.

4.10 蛋白质在高尔基体中的保留依赖于其跨膜区域

综述

Bretscher, M. S., and Munro, S., 1993. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* v. 261 p. 1280–1281.
Nilsson, T. and Warren, G., 1994. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 6 p. 517–521.
Pelham, H. R. and Munro, S., 1993. Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* v. 75 p. 603–605.

研究

Munro, S., 1995. An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.* v. 14 p. 4695–4704.
Nilsson, T., Hoe, M. H., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzele, G., Berger, E. G., and Warren, G., 1994. Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO J.* v. 13 p. 562–574.

4.11 Rab GTP酶和系链是两种控制膜泡靶向运输的蛋白

综述

Barr, F. A., and Warren, G., 1996. Disassembly and reassembly of the Golgi apparatus *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 7 p. 505–510.
Guo, W., Sacher, M., Barrowman, J., Ferro-Novick, S., and Novick, P., 2000. Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol.* v. 10 p. 251–255.
Pfeffer, S. R., 1999. Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* v. 1 p. E17–22.
Waters, M. G., and Hughson, F. M., 2000. Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* v. 1 p. 588–597.
Whyte, J. R., and Munro, S., 2002. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.* v. 115 p. 2627–2637.
Zerial, M., and McBride, H., 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 107–117.

研究

Salminen, A. and Novick, P. J., 1987. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* v. 49 p. 527–538.

4.12 SNARE 蛋白可能介导膜泡与靶膜的融合

综述

Brunger, A. T., 2001. Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* v. 30 p. 157–171.
Chen, Y. A., and Scheller, R. H., 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 98–106.
Ferro-Novick, S., and Jahn, R., 1994. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* v. 370 p. 191–193.
Gerst, J. E., 2003. SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1641 p. 99–110.
Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. C., 2003. Membrane fusion. *Cell* v. 112 p. 519–533.
Skehel, J. J., and Wiley, D. C., 1998. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* v. 95 p. 871–874.
Söllner, T. H., 2003. Regulated exocytosis and SNARE function (Review). *Mol. Membr. Biol.* v. 20 p. 209–220.
Toonen, R. F., and Verhage, M., 2003. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* v. 13 p. 177–186.

研究

Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., and Heuser, J. E., 1997. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* v. 90 p. 523–535.
Parlati, F., McNew, J. A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T. H., and Rothman, J. E., 2000. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* v. 407 p. 194–198.
Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E., 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fu-

sion. *Cell* v. 75 p. 409–418.

Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E., 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* v. 362 p. 318–324.

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T., 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* v. 395 p. 347–353.

4.13 胞吞过程通常由网格蛋白-有被小泡介导

综述

Lemmon, S. K., 2001. Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr. Biol.* v. 11 p. R49–R52.

Sever, S., Damke, H., and Schmid, S. L., 2000. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* v. 1 p. 385–392.

研究

Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T., 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* v. 419 p. 361–366.

Heuser, J., 1980. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J. Cell Biol.* v. 84 p. 560–583.

Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L., 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* v. 374 p. 190–192.

Kanaseki, T., and Kadota, K., 1969. The "vesicle in a basket." A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J. Cell Biol.* v. 42 p. 202–220.

Kirchhausen, T. and Harrison, S. C., 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell* v. 23 p. 755–761.

Kosaka, T., and Ikeda, K., 1983. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibire ts1. *J. Cell Biol.* v. 97 p. 499–507.

Merrifield, C. J., Moss, S. E., Ballestrem, C., Imhof, B. A., Giese, G., Wunderlich, I., and Almers, W., 1999. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat. Cell Biol.* v. 1 p. 72–74.

Musacchio, A., Smith, C. J., Roseman, A. M., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., and Pearse, B. M., 1999. Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Mol. Cell* v. 3 p. 761–770.

Pearse, B. M., 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* v. 97 p. 93–98.

Roth, T. F., and Porter, K. R., 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.* v. 20 p. 313–332.

Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., and De Camilli, P., 1995. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* v. 374 p. 186–190.

Ungewickell, E., and Branton, D., 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature* v. 289 p. 420–422.

van der Bliek, A. M., and Meyerowitz, E. M., 1991. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* v. 351 p. 411–414.

Woodward, M. P., and Roth, T. F., 1978. Coated vesicles: characterization, selective dissociation, and reassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 75 p. 4394–4398.

4.14 接头蛋白复合物连接网格蛋白和跨膜的待运蛋白

综述

Bonifacino, J. S., and Traub, L. M., 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 395–447.

Robinson, M. S., 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 167–174.

Robinson, M. S., and Bonifacino, J. S., 2001. Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 13 p. 444–453.

Setaluri, V., 2000. Sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: signals, pathways, and mechanisms. *Pigment Cell Res.* v. 13 p. 128–134.

研究

Anderson, R. G., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localize in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* v. 270 p. 695–699.

Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., and Owen, D. J., 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* v. 109 p. 523–535.

Confalonieri, S., Salcini, A. E., Puri, C., Tacchetti, C., and Di Fiore, P. P., 2000. Tyrosine phosphorylation of Eps15 is required for ligand-regulated, but not constitutive, endocytosis. *J. Cell Biol.* v. 150 p. 905–912.

Davis, C. G., Lehrman, M. A., Russell, D. W., Anderson, R. G., Brown, M. S., and Goldstein, J. L., 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* v. 45 p. 15–24.

Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., and Bonifacino, J. S., 1999. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 7278–7285.

Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W., and Bonifacino, J. S., 1997. AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* v. 16 p. 917–928.

Gaidarov, I., Chen, Q., Falck, J. R., Reddy, K. K., and Keen, J. H., 1996. A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* v. 271 p. 20922–20929.

Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L., 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* v. 383 p. 447–450.

Heuser, J. E., and Keen, J., 1988. Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J. Cell Biol.* v. 107 p. 877–886.

Matter, K., Hunziker, W., and Mellman, I., 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* v. 71 p. 741–753.

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J. S., 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* v. 269 p. 1872–1875.

Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B. M., McMahon, H. T., and Evans, P. R., 2000. The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.* v. 19 p. 4216–4227.

Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E., and Kirchhausen, T., 1998. Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* v. 17 p. 2148–2155.

Robinson, M. S., and Pearse, B. M., 1986. Immunofluorescent localization of 100K coated vesicle proteins. *J. Cell Biol.* v. 102 p. 48–54.

Simpson, F., Peden, A. A., Christopoulou, L., and Robinson, M. S., 1997. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* v. 137 p. 835–845.

Steinman, R. M., Brodie, S. E., and Cohn, Z. A., 1976. Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *J. Cell Biol.* v. 68 p. 665–687.

Ybe, J. A., Brodsky, F. M., Hofmann, K., Lin, K., Liu, S. H., Chen, L., Earnest, T. N., Fletterick, R. J., and Hwang, P. K., 1999. Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature* v. 399 p. 371–375.

4.15 某些受体从早内体进入再循环，而其他受体在溶酶体中被降解

综述

Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., and Hubbard, A., 1983. Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* v. 8 p. 245–250.

Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D., 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 893–905.

Mellman, I., 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 12 p. 575–625.

研究

Davis, C. G., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., Anderson, R. G., Russell, D. W., and Brown, M. S., 1987. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* v. 326 p. 760–765.

Geuze, H. J., Slot, J. W., and Schwartz, A. L., 1987. Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J. Cell Biol.* v. 104 p. 1715–1723.

Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J., 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* v. 64 p. 915–925.

Klausner, R. D., Ashwell, G., van Renswoude, J., Harford, J. B., and Bridges, K. R., 1983. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 80 p. 2263–2266.

Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y., 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* v. 12 p. 3663–3674.

Marsh, M., and Helenius, A., 1980. Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J. Mol. Biol.* v. 142 p. 439–454.

Marsh, M., Griffiths, G., Dean, G. E., Mellman, I., and Helenius, A., 1986. Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 83 p. 2899–2903.

McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M., 1999. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* v. 98 p. 377–386.

Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J. P., Tock, E. P., and Toh,

B. H., 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J. Biol. Chem.* v. 270 p. 13503–13511.

Prekeris, R., Klumperman, J., Chen, Y. A., and Scheller, R. H., 1998. Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J. Cell Biol.* v. 143 p. 957–971.

Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M., and Mellman, I., 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J. Cell Biol.* v. 145 p. 123–139.

Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H., 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* v. 394 p. 494–498.

4.16 早内体成熟为晚内体和溶酶体

综述

Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., and Hubbard, A., 1983. Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* v. 8 p. 245–250.

Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D., 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 893–905.

Kornfeld, S., and Mellman, I., 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 5 p. 483–525.

Mellman, I., 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 12 p. 575–625.

Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., and Cohn, Z. A., 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* v. 96 p. 1–27.

研究

Dunn, K. W., McGraw, T. E., and Maxfield, F. R., 1989. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* v. 109 p. 3303–3314.

Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Hopkins, C. R., 1990. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* v. 61 p. 623–634.

Gruenberg, J., Griffiths, G., and Howell, K. E., 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.* v. 108 p. 1301–1316.

Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D., 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* v. 106 p. 145–155.

Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y., 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* v. 12 p. 3663–3674.

Matteoni, R., and Kreis, T. E., 1987. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* v. 105 p. 1253–1265.

Schmid, S. L., Fuchs, R., Male, P., and Mellman, I., 1988. Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* v. 52 p. 73–83.

4.17 溶酶体蛋白的分选发生在高尔基体反面网状结构

综述

Bonifacino, J. S., and Traub, L. M., 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 395–447.

Kornfeld, R. and Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* v. 54 p. 631–664.

Kornfeld, S., 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* v. 61 p. 307–330.

Kornfeld, S., and Mellman, I., 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 5 p. 483–525.

Stack, J. H., Horazdovsky, B., and Emr, S. D., 1995. Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 1–33.

研究

Boman, A. L., Zhang, C., Zhu, X., and Kahn, R. A., 2000. A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell* v. 11 p. 1241–1255.

Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P., and Pfeffer, S. R., 2001. Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* v. 292 p. 1373–1376.

Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S. D., and Payne, G. S., 2001. Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol. Biol. Cell* v. 12 p. 1885–1896.

Darsow, T., Burd, C. G., and Emr, S. D., 1998. Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the func-

tional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J. Cell Biol.* v. 142 p. 913–922.

Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M., and Bonifacino, J. S., 2000. GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* v. 149 p. 81–94.

Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P., and Kornfeld, S., 2002. Interaction of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor with GGA proteins. *J. Biol. Chem.* v. 277 p. 18477–18482.

Geuze, H. J., Stoorvogel, W., Strous, G. J., Slot, J. W., Bleekemolen, J. E., and Mellman, I., 1988. Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytic vesicles. *J. Cell Biol.* v. 107 p. 2491–2501.

Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N., and Robinson, M. S., 2000. A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* v. 149 p. 67–80.

Howe, C. L., Granger, B. L., Hull, M., Green, S. A., Gabel, C. A., Helenius, A., and Mellman, I., 1988. Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 85 p. 7577–7581.

Kornfeld, S., and Sly, W. S., 1985. Lysosomal storage defects. *Hosp Pract (Off Ed)* v. 20 p. 71–75, 78–82.

Pelham, H. R., 1988. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* v. 7 p. 913–918.

Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J., and Bonifacino, J. S., 2001. Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* v. 292 p. 1712–1716.

Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V. P., and Kornfeld, S., 2001. Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* v. 292 p. 1716–1718.

4.18 极性上皮细胞运输蛋白质到顶部和基底外侧部质膜

综述

Drubin, D. G., and Nelson, W. J., 1996. Origins of cell polarity. *Cell* v. 84 p. 335–344.

Griffiths, G., and Simons, K., 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* v. 234 p. 438–443.

Mellman, I., 1995. Molecular sorting of membrane proteins in polarized and nonpolarized cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* v. 60 p. 745–752.

Mostov, K. E., Verges, M., and Altschuler, Y., 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 12 p. 483–490.

Munro, S., 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* v. 115 p. 377–388.

Rodriguez-Boulan, E., and Powell, S. K., 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 8 p. 395–427.

Simons, K., and Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* v. 387 p. 569–572.

研究

Ang, A. L., Taguchi, T., Francis, S., Fölsch, H., Murrells, L. J., Pypaert, M., Warren, G., and Mellman, I., 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J. Cell Biol.* v. 167 p. 531–543.

Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S., and Mellman, I., 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* v. 99 p. 189–198.

Matter, K., Whitney, J. A., Yamamoto, E. M., and Mellman, I., 1993. Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* v. 74 p. 1053–1064.

Matter, K., Yamamoto, E. M., and Mellman, I., 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* v. 126 p. 991–1004.

Rindler, M. J., Ivanov, I. E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E., and Sabatini, D. D., 1984. Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* v. 98 p. 1304–1319.

Scheiffele, P., Peränen, J., and Simons, K., 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* v. 378 p. 96–98.

Wandinger-Ness, A., Bennett, M. K., Antony, C., and Simons, K., 1990. Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 987–1000.

4.19 某些细胞储存蛋白质用于分泌

综述

Case, R. M., 1978. Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* v. 53 p. 211–354.

Gerber, S. H., and Südhof, T. C., 2002. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* v. 51 Suppl 1 p. S3–11.

Huttner, W. B., Ohashi, M., Kehlenbach, R. H., Barr, F. A., Bauerfeind, R., Bräunling, O., Corbeil, D., Hannah, M., Pasolli, H. A., and Schmidt, A., 1995. Biogenesis of neurosecretory vesicles. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* v. 60 p. 315–327.

Palade, G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* v. 189 p. 347–358.

Schiavo, G., Osborne, S. L., and Sgouros, J. G., 1998. Synaptotagmins: more isoforms than functions? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 248 p. 1–8.

Südhof, T. C., and Rizo, J., 1996. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* v. 17 p. 379–388.

Warren, G., and Mellman, I., 1999. Bulk flow redux? *Cell* v. 98 p. 125–127.

研究

Bendayan, M., 1984. Concentration of amylase along its secretory pathway in the pancreatic acinar cell as revealed by high resolution immunocytochemistry. *Histochem. J.* v. 16 p. 85–108.

Dittié, A. S., Klumperman, J., and Tooze, S. A., 1999. Differential distribution of mannose-6-phosphate receptors and furin in immature secretory granules. *J. Cell Sci.* v. 112 (Pt 22) p. 3955–3966.

Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J. M., Geuze, H. J., and Arvan, P., 1998. Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J. Cell Biol.* v. 141 p. 359–371.

Martínez-Menárguez, J. A., Geuze, H. J., Slot, J. W., and Klumperman, J., 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* v. 98 p. 81–90.

连慕兰　译

第3篇　细　胞　核



第5章　细胞核结构与转运

Charles N. Cole
Departments of Biochemistry and Genetics，Dartmouth Medical School，Hanover，NH
Pamela A. Silver
Department of Systems Biology，Harvard Medical School，Boston，MA

本章概要

5.1 导言

关键概念

- 细胞核包含了大部分的细胞 DNA，涉及基因表达的复杂调控。
- 核被膜是双膜结构，包被细胞核。
- 细胞核包含的亚单位没有膜的界限。
- 核被膜上有核孔，负责将蛋白质运入细胞核内，将 RNA 和蛋白质运出细胞核外。

当你在光镜下观察真核细胞时，细胞核是最大的可见部分，如图 5.1。事实上，真核细胞的意思是“真的细胞核”，并且拥有一个细胞核是真核细胞的一个定义特征。细胞核包含几乎所有的真核细胞遗传物质并作为控制细胞活动的中心（小部分 DNA 存在于线粒体中，植物中的 DNA 有的也存在于叶绿体中）。

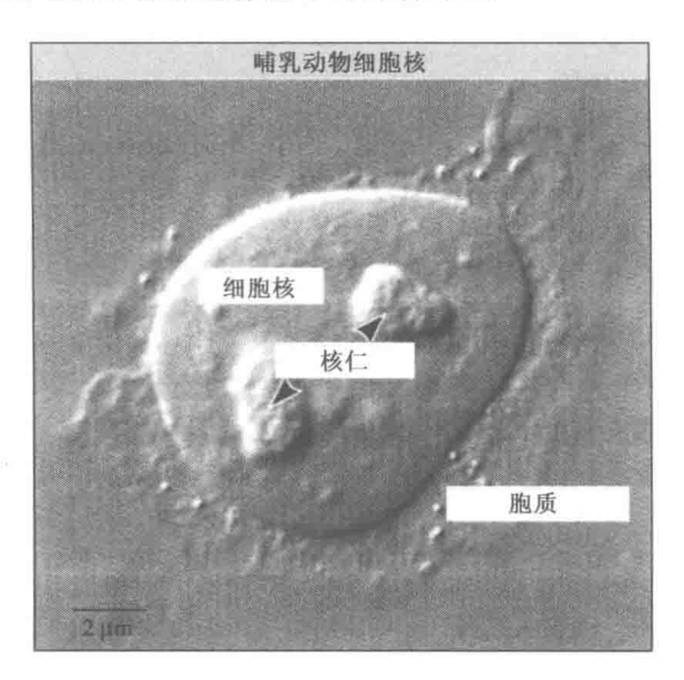


图 5.1　人类宫颈癌细胞系 Hela 具有一个细胞核，可在光学显微镜下观察到。照片由 Carnegie 研究所的 Zheng'an Wu 和 Joseph Gall 惠赠。

Antony van Leeuwenhoek（1632～1723）可能是第一次观察到细胞核的人。当他观察两栖类和鸟类血液细胞时，记录下细胞中心位置的“清晰区域”存在。然而，细胞核的发现者被授予修道士 Felice Fontana（1730～1805），1781 年，他描绘的美洲鳗皮肤表皮细胞的细胞核是一卵圆形结构。苏格兰植物学家 Robert Brown（1773～1858）记录了他所观察的所有植物细胞都包含“一个圆圈样网眼状空隙，与细胞的质膜相比较不透明（灰暗）”。他是第一个称这种结构为细胞核的人，细胞核这一单词来源于拉丁文果仁（*kernel*）。

细胞核的双层膜被称为核被膜，包被细胞核。这两层膜被一个内腔分开，它与内质网邻近。核孔复合体（NPC）横跨核被膜，是细胞核与细胞质之间输送大分子的通道。与蛋白质穿过内质网或线粒体膜相比较（见第 3 章蛋白质的膜定向转移），蛋白质穿过

核孔复合体时是完全折叠的。

细胞核所包含的亚单位没有被膜包被，这些亚单位有其特殊的功能。唯一的可以在光镜下看到的核亚单位就是核仁（见图 5.1），在那里合成核糖体 RNA 以及装配核糖体亚单位。其他的核亚单位可用免疫荧光显微镜揭示。它们包括小斑块，其中储存着 RNA 剪接因子和复制因子。细胞核的非核仁区常常被称为核质。

细胞核中的 DNA 存在不同的构型（见 6.2 染色质可分为常染色质和异染色质）。在电子显微镜下，因为其相对的高度折叠，一些 DNA 表现为深着色，这种 DNA 被称为异染色质，它没有转录活性。大多数异染色质邻近核被膜。另一些 DNA 的折叠压缩程度低，称为常染色质，而常染色质具有转录活性，表达的基因在此部分被发现。在大多数细胞，更多的 DNA 是在常染色质部分而不是在异染色质部分。

一个具有细胞核的真核细胞的优势是什么？细胞核保护细胞 DNA 并且使其具有复杂的基因调控。真核细胞比原核细胞含有更多的 DNA，在某些情况下多于 10 000 倍。这些 DNA 被折叠为染色体，每一个折叠为一个 DNA 分子（见第 6 章染色体和 5.3 染色体占据不同的区域）。一条染色体 DNA 双链的断裂对细胞可能是一个致死事件。在细胞的间期，DNA 相对处于伸展状态，这样 DNA 复制酶和那些可以生产 RNA 的酶可以接近 DNA。当其处于松散状态时，DNA 很容易受到破坏。动态的细胞骨架产生的剪切力可以破坏 DNA，所以在间期的细胞核不保护核内的 DNA。相对来说，在有丝分裂

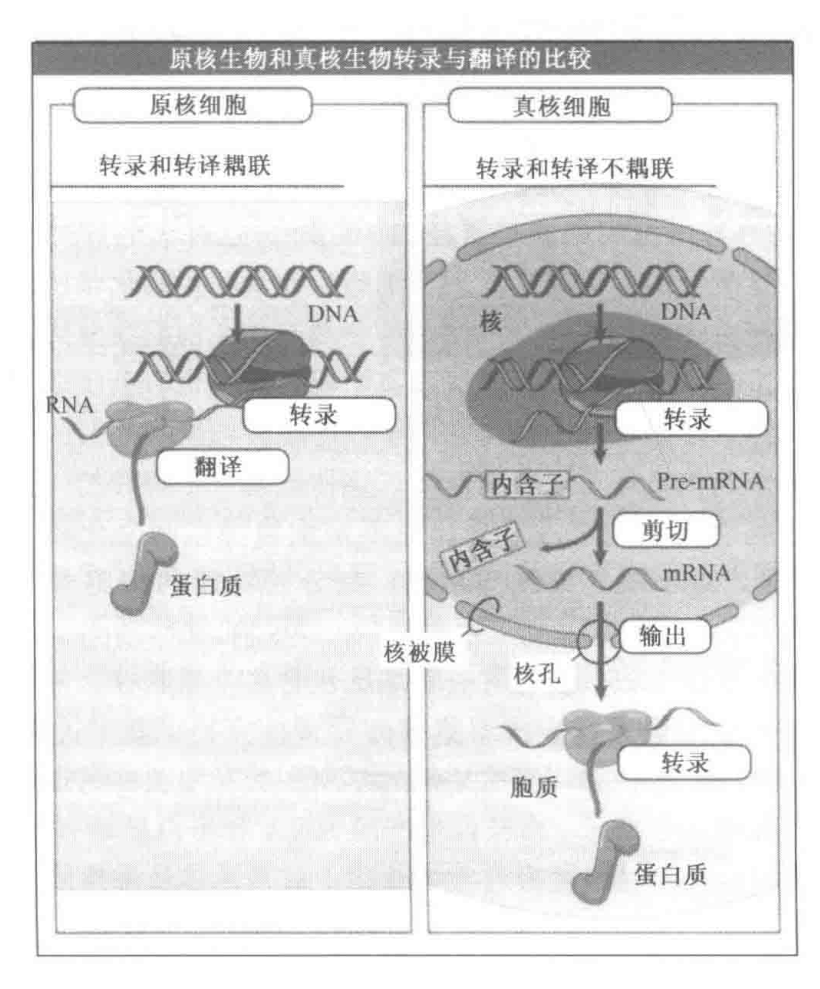


图 5.2　原核生物，转录和翻译耦联在一起（左图）。真核生物转录发生在细胞核中，而翻译在细胞质中进行（右图）。

期，染色体非常紧致，伴随DNA折叠形成一个高度有序的结构。虽然在有丝分裂期间细胞核膜降解，DNA暴露于细胞质环境，浓缩的染色体易于抵抗由细胞骨架所产生的剪切力的破坏。

有细胞核的细胞比原核细胞具有更复杂的基因表达调控。在原核细胞中，DNA直接转录为mRNA，转录和翻译耦联在一起：mRNA的翻译在转录完成前就开始。由于真核细胞的细胞质和细胞核是分开的，很多大分子必须在细胞核与细胞质之间被运输。例如，mRNA在核内被转录和加工并且运输到细胞质，在细胞质中有定位的蛋白质合成机制。图5.2是原核细胞和真核细胞的加工过程比较。许多蛋白质在细胞核的复制、转录和其他细胞核加工过程中是必需的，所以它们必须从细胞质输入到细胞核中。核糖体亚基由多种RNA在细胞核中装配，它们在核中合成，大约有100多种蛋白质要从细胞质中运入细胞核。所有这些大分子运入或运出细胞核都通过核孔复合体。重要的是，分子的运入和运出细胞核可以被调控。

5.2 细胞核表型在不同细胞类型和生物体中有区别

关键概念

- 细胞核大小范围从直径大约1μm到大于10μm。
- 大多数细胞有一个细胞核，但是有些细胞有多个细胞核，少数细胞缺少细胞核。
- 异染色质占基因组的比例因细胞种类不同而不同，并且细胞分化程度越高其所占比例也越高。

细胞核的大小与其包含的DNA的数量相关。在单个真核细胞中发现最小的细胞核直径大约1μm，例如面包酵母、酿酒酵母。许多多细胞生物细胞的细胞核直径是5～10μm。非洲爪蟾的卵母细胞的细胞核直径约400μm，这种大的卵母细胞（直径1mm）由于其细胞核大并且数量多，使其广泛用于细胞生物学和生物化学的研究中。当卵母细胞被破裂后，细胞核由于重力被离心沉淀，可使细胞核和细胞质分离，便于进行生物化学的内含分析以及进行光学和电子显微镜形态学研究，这也有利于进行细胞核或细胞质显微注射，例如非洲爪蟾卵母细胞被广泛用于细胞核和细胞质之间的大分子转运研究。

大多数细胞的细胞核是球形或者椭圆形，这使覆盖一个物种的体积所需表面积减到最小。细胞核在细胞总体积中所占百分比在不同细胞类型间变化较大，酵母为1%～2%，体细胞为10%，对于缺乏细胞质功能，如分泌功能的细胞可占到40%～60%。（见第3章蛋白质的膜定向转移）。

大多数细胞有一个细胞核；但也有一些细胞包含多个细胞核，并且少数分化细胞类型缺少细胞核。当一个细胞进行多次细胞核分裂（核分裂）而不进行细胞分裂（质分裂）时多核细胞可以形成。例如，黑腹果蝇的早期胚胎和相关的昆虫，一般细胞质中包含数百个细胞核，如图5.3所示。在核内生产的RNA和蛋白质通过细胞质运动建立梯度，这对于后期果蝇的前后轴发育具有重要作用。其他的多核细胞的形成是当细胞融合形成一个合胞体时完成。例如，成熟的肌肉细胞（肌细胞）是由前体细胞（成肌细胞）融合而成。少数分化的细胞类型缺少细胞核，如哺乳动物成熟红细胞、血小板以及一些脊椎动物的晶状体细胞。

细胞核的形状和表型是区分不同细胞类型的两个要素。例如，白血病是血液性疾

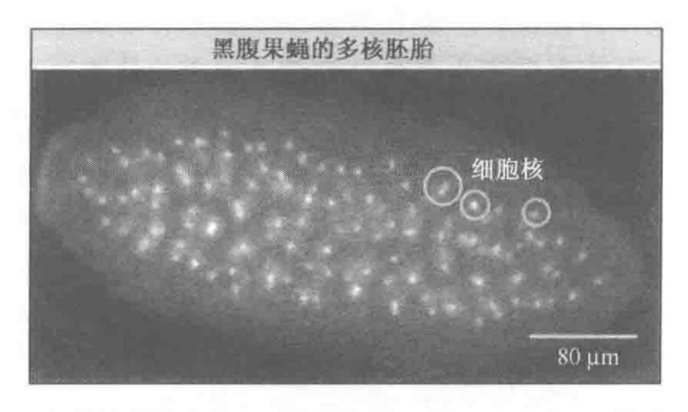


图 5.3　在多核期的黑腹果蝇的胚胎。DNA 用 DAPI 染色。照片由 Dartmouth 学院的 Sharon Bickel 惠赠。

病，其患者的白细胞数比正常人要高很多。经过几个阶段的分化，白细胞类型也很多。在每一个阶段，每个细胞类型的细胞核具有一定的特征。在临床检验中，一种重要的检测手段就是测试白血病患者的白细胞的细胞核形态学。

另一种通过细胞核特征鉴定细胞类型的方法是异染色质的染色体基因组分析。例如，未成熟的红细胞分化成成熟的红细胞，越来越多的 DNA 变为异染色质。增长的异染色质由于多数基因永久的沉默，所以几乎所有的在成熟的红细胞中产生的 mRNA 是球蛋白 mRNA。在某些物种，红细胞细胞核最终被逐出，遗留下一个血红素细胞膜"袋"和其他在血液循环中用来携带氧气和二氧化碳的蛋白质。很明显，只有在细胞核丢失后，血红细胞需要新的形状，即一个两面凹陷的圆盘状，其有利于通过毛细血管的简单通路。

5.3　染色体占据不同的区域

关键概念

- 虽然细胞核缺少内膜，但是细胞核是高度组织性的并且包含许多亚单位。
- 每一个染色体占据一定的区域或者领域，以阻止染色体彼此纠缠。
- 细胞核包含染色体区和染色体间区。

细胞质的一个显著特征是以膜为界限的细胞器的区室作用，从而为细胞功能提供最理想的环境。相反，细胞核缺少内膜，但是它具有高度组织性。那里有许多亚单位可为核内发生的重要事件提供最优的生物化学环境条件。在本节，我们考虑整个染色体的组织。在 5.4 细胞核包含非膜界限的亚单位和 5.5 某些加工过程发生在细胞核特定的区域，预示有潜在结构存在，我们讨论细胞核加工过程的定位，如核糖体亚单位组装和 DNA 复制。

在细胞核内，一套染色体是高度有组织的。这种组织性可通过细胞被固定处理，不同的染色体带可以染成不同的颜色来显示。荧光显微镜图示染色体不缠绕在一起，如图 5.4 所示，它们在空间中有序地排列，每个染色体位于一定的区域，称为染色体区、结构域或领域。如果染色体纠缠或混乱在一起，有丝分裂时，为了避免染色体受到破坏，在染色体分离前需要被松开。在其各自的领域隔离每一条染色体就可以避免这个问题。

我们不知道染色体领域如何被保持，但在许多细胞类型中，染色体末端称为端粒，端粒被锚定在核被膜上，这可能帮助阻止染色体缠绕在一起。

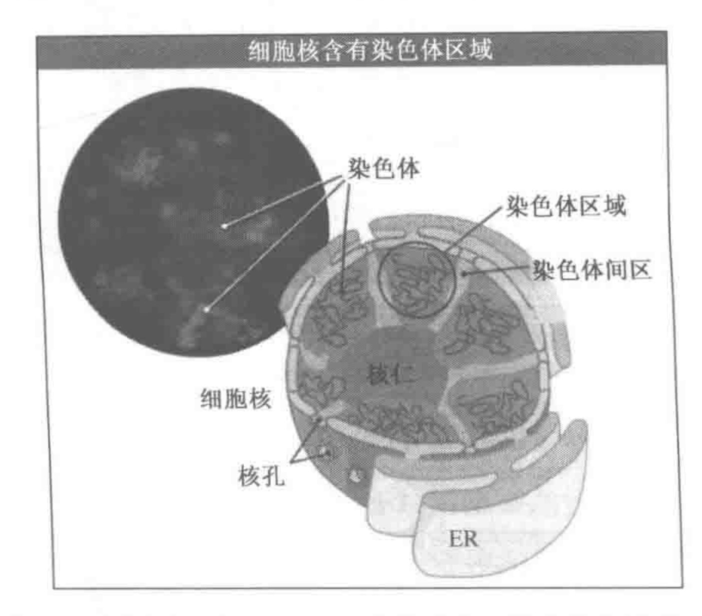


图 5.4　单个染色体占据细胞核特定的区域称染色体区。照片由 Thomas Reid 惠赠。

染色质不能填满整个细胞核。有染色质定位的区域称为染色体区，而邻近的没有染色质的区域称为染色体间区，如图 5.4 所示。染色体间区包含带有多聚腺苷酸尾巴的 RNA [poly（A）+RNA]，它们经过最后的加工步骤，然后扩散到核外围准备输出核。（见图 5.27；5.22 hnRNP 从加工位点向 NPC 运动）。

有一个更深层次的染色体组织水平，也就是说，基因是否直接位于邻近的染色体间区。原位杂交和复杂的影像技术使我们能够测定一个特定基因在细胞核中的位置以及它的转录定位。这些研究表明高转录基因趋于染色体区外围，邻近染色体间区。因为不同的细胞类型活化不同的基因，依据细胞类型，邻近染色体间区的基因有一定变化。在一定区域的染色体的结构是不固定的，其变化因基因表达的模式改变而改变（细胞核的表型因细胞类型和生物体的不同而变化）。通过它们与染色体间区的接近，最丰富的 mRNA 可能将更加易于通过这些区域扩散到核孔复合体，从而推动它们向细胞质的运输。另外，活化的转录基因经常定位于核孔复合体附近，这可能有效推动编码的 mRNA 输出到细胞质（核孔复合体的细节见 5.9 核孔复合体是双向通道）。

5.4　细胞核包含非膜界限的亚单位

关键概念

- 细胞核亚单位没有膜界限。
- rRNA 在核仁合成，核糖体亚单位在核仁聚集。
- 核仁包含的 DNA 编码 rRNA，并在很多染色体中存在。
- mRNA 剪接因子在核斑块储存，并转移到它们的转录位点发挥其功能。
- 其他的核体（nuclear body）可以用抗体鉴定，但是大多数的功能是不知道的。

发生在细胞核内的主要事件包括基因表达的很多步骤，例如转录和 RNA 的加工。这些加工过程发生在核仁离散的位置。我们知道关于核仁的许多功能，其他的亚单位已有描述，但大多数有关它们的功能还不清楚。

细胞核最显著的亚单位是核仁（见图 5.1）。大多数正常细胞有单个的细胞核，但有时在细胞中也发现有多核仁，如图 5.1 所示。核仁是核糖体 RNA 合成和加工以及核糖体亚单位装配的地方。核仁的大小改变依赖于一个给定的细胞中核糖体生物产生的数量。

核仁包含所有核糖体亚单位装配所必需的组分，从而提供一个有效的装配位点。这些组分包括来自用于多条染色体的 rRNA 基因、rRNA，用于 rRNA 合成和加工的酶以及从细胞质输入的核糖体蛋白。在核仁内有多种形态学上的明显区域，图 5.5 反映了 rRNA 基因的转录、rRNA 加工和亚单位装配发生在核仁的不同区域。

细胞核包含亚单位

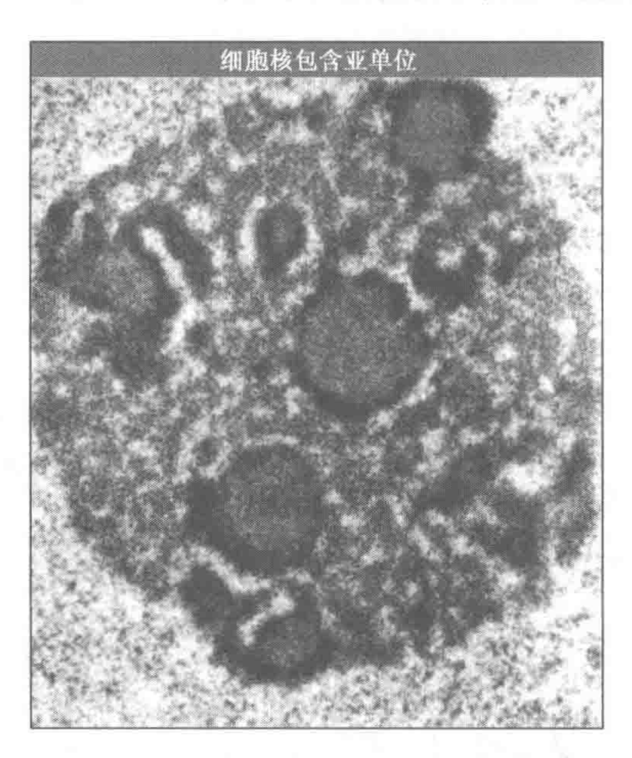


图 5.5　在电子显微镜下可观察核仁内的亚单位。照片由 Don W. Fawcett 博士惠赠，复制自 *Cell*，1981，显微照片来自人口委员会的 David M. Phillips。

虽然核仁缺少一个膜，但是其中的大多数蛋白质和 RNA 存在于核仁内，并且只在核仁里被发现，在细胞核内其他地方没有。当核糖体亚单位生产时核仁就可被检测到。当 rRNA 转录被人为实验阻断时，核仁消失，当转录被允许时，核仁又重新出现。因此，核仁被认为是在 rRNA 基因聚集在一起时发生，转录因子结合在 rRNA 基因的启动子上，并且通过转录因子招募 RNA 聚合酶Ⅰ分子。最新合成的 rRNA 可能交替吸引核糖体蛋白并且以一种有序的顺序，很多必需的加工因子来装配核糖体亚单位（见 MBIO：5-0001）。我们还不知道招募的顺序。通过一种现在还不了解的机制，在有丝分裂期核仁被卸载并且当有丝分裂完成后再重新装配。

核仁的功能没有限制在核糖体亚单位的生物生产（生源论）上。tRNA 基因在核仁中成群，它们在核仁中被转录并在这里开始 tRNA 加工。许多蛋白质并不参与在核仁

中的核糖体亚单位的形成。在很多情况下，我们不知道为什么它们有一个核仁位置。在其他情况下，蛋白质在细胞核中的功能可能被屏蔽或扣压在核仁内，并且可能被很快释放进入核浆而行使其功能。一些细胞周期调节蛋白进入这种类型（见MBIO：5-0002）。培养的人类细胞核仁蛋白质组学分析表明，它们包含超过400个不同的多肽，并且其中30％是新的或没有特征的。

其他几个小的离散的细胞核亚单位已能够检测，其主要是通过来源于具有自身免疫疾病的患者抗体或对特异的核蛋白具有反应性的制备抗体。这些抗体主要检测离散型亚单位，离散型亚单位不仅可通过光镜检测，也可利用荧光或在某些情况下用免疫电子显微镜检测。有时称其为核体，这些亚单位在许多类型的真核细胞中出现，并且没有膜界限。他们包含核斑块（speckle）、卡哈氏体（Cajal body）、双子氏体（Gemini body）和PML 体。核体的一个功能可能是提高多种大分子的生物加工效率。

RNA 剪接因子在细胞核中的核斑进行空间组构。图 5.6 表明每个细胞的剪接因子大约聚集在20～50个斑块，但是这些剪接因子同样被分散定位在很多其他被称为染色质间颗粒位点。因为斑块不包括前体 mRNA，他们被认为用来储存剪接因子而不是剪接因子。剪接被认为发生在更分散的染色区，在那里多聚腺苷酰化 RNA 和剪接因子一起被探测。支持这一假说的实验如图 5.6 所示。如果用 RNA 聚合酶Ⅱ的抑制剂使转录阻断，当这些因子重新定位在斑块处，更多的剪接因子的弥散分布消失。当通过 RNA 聚合酶Ⅱ使转录重新开始，更多的弥散分布的染色模式再次出现。

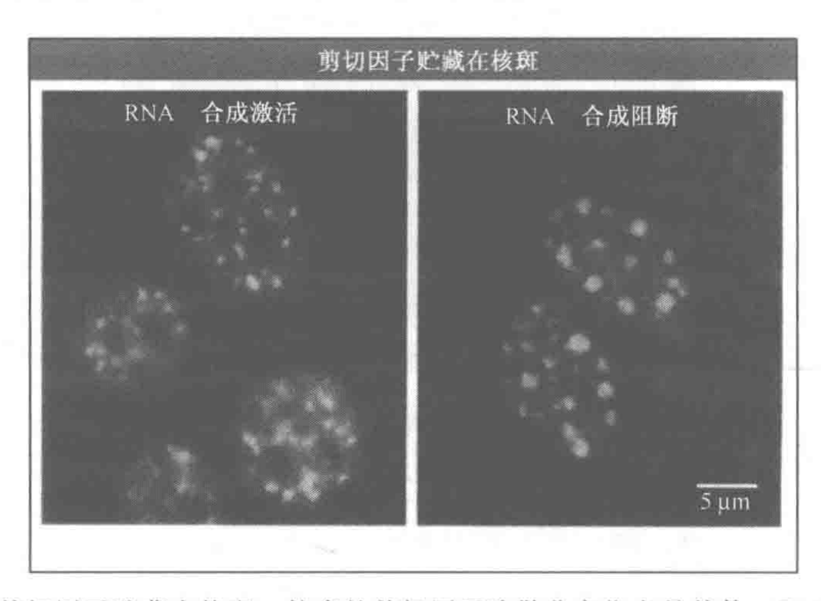


图 5.6 剪切因子贮藏在核斑。较多的剪切因子弥散分布位点是前体 mRNA 加工位点（左）。放线菌素 D 阻断转录（右）。核斑定位采用间接免疫荧光，所用抗体针对 U2 SnRUNP β-剪切因子组分。照片由冷泉港实验室的 David Spector 惠赠。

一些剪接因子同样具有不同的结构，卡哈氏体或螺旋体，如图 5.7 所示，细胞核只有一个或几个卡哈氏体，通常接近核仁。它们包含一个蛋白质，称为螺旋体，在斑块中不存在。我们知道卡哈氏体不参与剪接酶加工过程，因为卡哈氏体不包含前体 mRNA，但是他们确实包含小的核 RNA（snRNA）和小核仁 RNA（snoRNA），并且被认为是这些 RNA 被转录后修饰和装配成核糖体蛋白复合体的位点（snRNA 的细节见MBIO：5-0003和 5.24 U snRNA 复合体的输出、修饰、组装复合体和输入。snoRNA

的细节见MBIO：5-0004和EXP：5-0001）。另一个核体，双子氏体或GEM，同样在图5.7中可见。双子氏体不是在所有细胞都存在，但双子氏体的一些组分可在卡哈氏体中发现，暗示它们可能不行使独特的功能。

PML小体（核小体）是另一个核亚单位。之所以称其为PML小体，是因为PML小体包含的一个蛋白质与首次发现的携带前髓细胞的白血病病人的蛋白PML相关，人们利用从这些病人上得到的抗体第一次鉴定出PML蛋白。PML蛋白招募很多其他的蛋白，导致PML小体的形成，但是PML小体的功能还不清楚。他们不参与DNA复制、转录或者RNA加工，并且他们不储存剪接因子。

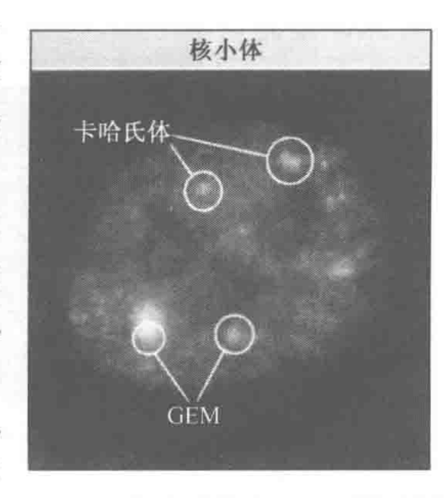


图5.7　卡哈氏体和GEM可用特异性抗体和间接免疫荧光检测。照片复制自Spector D. L. *J. Cell Sci*. 2001. 114：2891-2893。获得Biologists Ltd. 公司许可。照片由Gerg Matera惠赠。

许多小的核体表现缺少单细胞真核生物的小细胞核，如酵母。然而，酵母细胞包含的核体类似于卡哈氏体。很有可能也存在其他的核体，但因为这些核体比多细胞动物的细胞中的核体还小，所以他们可能更加难以检测。

5.5　某些加工过程发生在细胞核特定的区域，预示有潜在结构存在

关键概念

- 细胞核包含DNA合成的复制位点。
- 细胞核可能包含核骨架，帮助组织细胞核功能。

我们之前已经讨论了一些细胞核结构域和亚单位，它们具有独特的成分和功能（见5.3染色体占据特定的区域和5.4细胞核包含非膜界限的亚单位）。其他过程，如DNA复制，同样在细胞核内被组织。可以想象，DNA复制和RNA剪接机制可能与潜在的细胞核结构相关。

在S期的早期，当DNA被合成时，细胞包含很多DNA复制位点。当进入S期时，这些位点聚合并且只有少数较大的位点可以检测，这些较大的位点称为复制工厂。图5.8展示S期不同阶段的复制工厂的分布。每一个复制工厂都包含数百个复制起点，而且很多复制起点不是同时启动，而是在S期中的不同时间启动。类似的研究表明转录可能发生在一定的限制位点上，称为转录工厂。

细胞核加工定位于不连续（弥散）位点，表明可能在细胞核内有一个潜在的结构。细胞核不包含一种高度有序的骨架类似于细胞骨架。但是，一些研究表明一种纤维状网络状结构，称为核基质，可能存在于细胞核。对比易于观察的细胞骨架，这种网络状结构只有当细胞核用去垢剂、DNase和高浓度盐处理后才能看到。这些处理方法抽取了很多物质，包括几乎所有的DNA和所有的膜成分，并且只留下不能溶解的蛋白质和一些RNA。这种网络状结构包含短纤维（大小是中间纤维）、肌动蛋白（不是纤维状结构）和许多其他的蛋白质。这些组分不能够被组装成任何其他更大的结构。

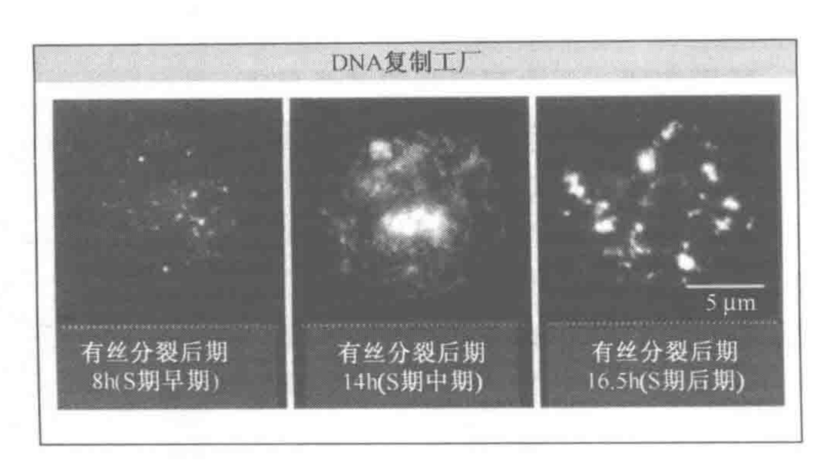


图 5.8 DNA 复制发生在有限的被称为复制工厂的位点。DNA 用 BrdU 标记，荧光团结合抗体检测。图示有丝分裂后不同时间的细胞。照片复制自 Hozak，P.，Jackson，D. A.，and Cook，P. R.，*J. Cell Sci*. 1994. 107：2191-2202. 获得 Biologists Ltd. 公司许可。照片由 Peter Cook 惠赠。

因为核基质相对不溶解，所以很难将其作为一个整体进行研究。一些细胞生物学家认为核基质是一个人造物品，因为它只有在充分的抽提之后才能看到。然而，因为很多重要的和复杂的加工过程发生在细胞核，并且必须是精确地进行，所以某些潜在的组织构架的存在是可能的（见 6.4 真核生物 DNA 含有结合到染色体支架上的袢环和结构域和 6.5 特定的序列使 DNA 附着到间期核基质上）。

这种细胞核结构的一个可能的功能是为复制、转录和 RNA 加工提供组织机制，这些过程是分别通过复制颗粒（复制体）、RNA 聚合酶Ⅱ全酶复合体以及剪接体完成的。虽然这些大的多亚单位的复合体的质量比染色体小，但他们的直径比它们的核苷酸底物要大许多。结构研究显示这些复合体包含裂口或核酸链的通道。（见MBIO：5-0005和MBIO：5-0006）。许多研究表明这些复合体敷于一个潜在的结构上，如图 5.9 所示。这

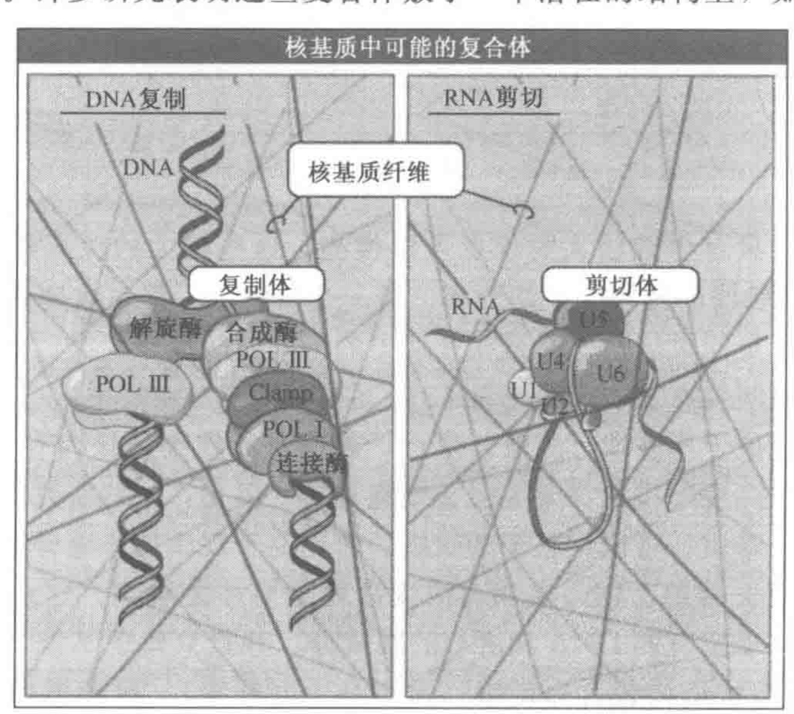


图 5.9 DNA 复制和 RNA 剪切的酶学机制被锚定在核基质。

表明当在复制、转录和剪接发生时，蛋白质机制可能被固定，而核酸可能借助复合体运动。

5.6 细胞核的界限是核被膜

关键概念

- 细胞核由双层完整的膜组成的核被膜所包被。
- 外核膜与内质网膜相连通，核被膜腔与内质网膜腔相连通。
- 核被膜上有许多核孔复合体（NPC），它们是细胞核和细胞质之间分子和大分子运输的唯一通道。

细胞核以核被膜为界限，核被膜由两个单位膜组成，分外核膜和内核膜。核膜均包含有一套特定的蛋白质和一个完整的磷脂双层膜。除了在一些单细胞真核生物中，纤维网络被编织成一个网络结构，支持内核膜（见图 5.7）。

外核膜与内质网膜连通，如同大多数内质网，外核膜表面附有核糖体，负责蛋白质的合成。

内、外核膜之间的空间是膜间腔。如同核被膜的外膜连通内质网膜，核被膜的膜间腔与内质网的膜间腔相连通。核膜的厚度约 7～8nm，膜间腔大约 20～40nm。

在电子显微镜下核被膜最显著的特征是核孔复合体，它作为在细胞质和细胞核之间运输大多数分子的通道（见 5.9 *核孔复合体是双向通道*）。大多数细胞的核被膜表面每平方毫米包含约 10～20 个 NPC（核孔复合体）。然而，酵母细胞有 150～250 个 NPC，而哺乳动物体细胞包含 2000～4000 个 NPC。有些细胞含有更高密度的 NPC，很可能是因为细胞在转录和翻译过程中非常活跃，需要很多大分子输入和输出细胞核。例如，两栖类卵母细胞的细胞核表面几乎完全被核孔复合体覆盖，如图 5.10 所示。

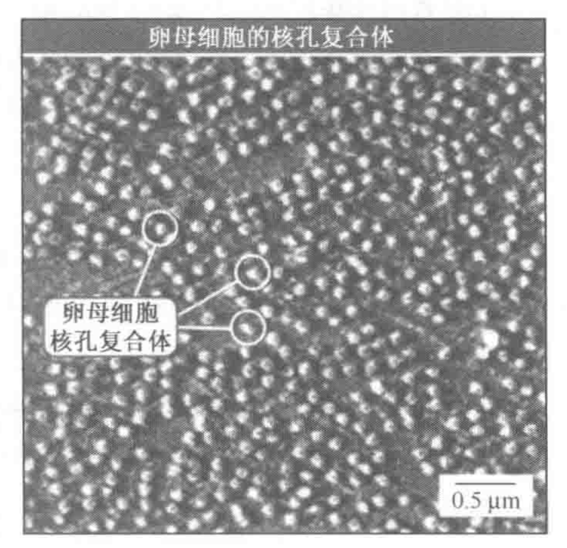


图 5.10 核孔复合体覆盖非洲爪蟾卵母细胞的核被膜表面。原子力显微图像复制自 *J. Mol. Biol.* vol. 287，Stoffler，D.，et al.，Calcium-mediated Structural Changes …，pp. 741-752。Copyright 1994，获得 Elsevier 版权许可。照片由 Basel 大学的 Ueli Aebi 惠赠。

细胞核的双层膜是如何产生的？这与真核细胞的两个细胞器有关——线粒体和叶绿体。内共生体假说推测在进化过程中当细胞内吞其他细胞时产生这些细胞器。被吸收的细胞将被两层膜包围：细胞本身和被吞入的细胞。被吞食细胞的一种类型可能已经提供了一种行为，例如光合作用，内吞的细胞缺乏此功能。线粒体和叶绿体内共生体起源的最好的证据是两个细胞器的核糖体都与现代原核生物的核糖体更接近，而与真核生物的核糖体相去甚远。我们不能确定细胞核的起源，然而，它有一个双膜结构，类似于线粒体和叶绿体，从而导致这个假说是内化的原核生物进化成拥有几乎所有细胞的 DNA，从而变为细胞核，如图 5.11 所示。

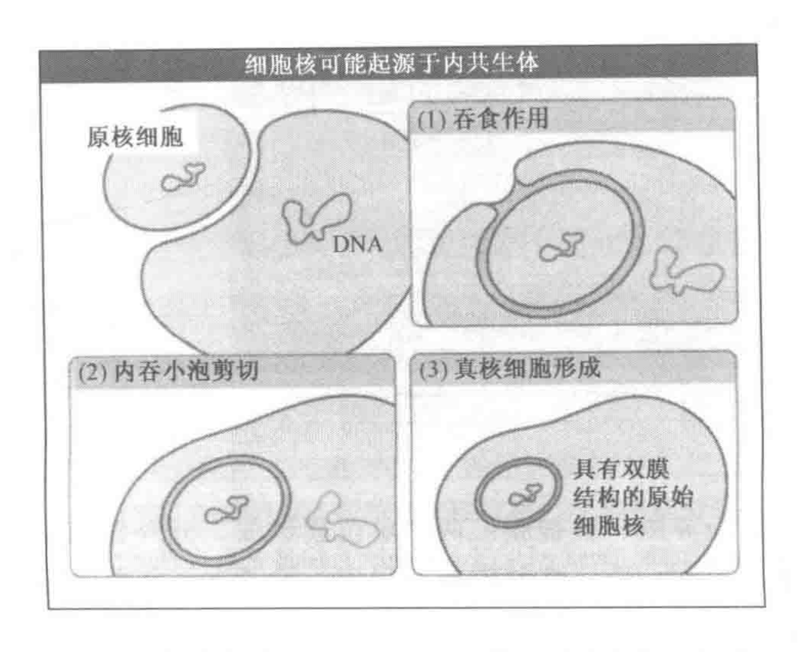


图 5.11　细胞核可能起源于内共生体，原核生物细胞吞食其他细胞变成原始细胞核。

5.7　核纤层在核被膜之下

关键概念

- 核纤层由被称为核纤层蛋白的中间纤维蛋白构成。
- 核纤层位于核内膜之下，与核膜通过核纤层相关的整合膜蛋白物理（机械）连接。
- 核纤层在核被膜装配中起重要作用，为核被膜提供物理（机械）支撑。
- 蛋白质连接核纤层与染色质，这将有利于核纤层组织 DNA 复制和转录。
- 酵母和一些其他的单细胞真核生物缺少一个核纤层。

多细胞动物的细胞核的一个普遍特征是具有核纤层，位于内核膜之下的一种中间纤维网络（见第 9 章中间纤维）。核纤层很容易通过间接免疫荧光来观察，方法是使用可以识别核纤层某种蛋白质的抗体。核纤层是一纤维状网络，典型的非组装核纤层蛋白纤维直接位于核内膜之下。

核纤层蛋白与胞质中间纤维的角蛋白有关。核纤层蛋白和角蛋白都被称为中间纤维蛋白，因为它们形成丝的大小（直径 10～20nm）介于肌动蛋白微丝（直径 7nm）和微管（直径 25nm）之间。核纤层被 NPC 遮断，NPC 锚定在核纤层。

除了核纤层蛋白，核纤层也包含一套整合膜蛋白称为核纤层相关蛋白（LAP），它们中的一些蛋白质介导核纤层和内核膜之间的相互作用。如图 5.12 所示，核纤层通过两种形式被锚定在核内膜上。一种是在核纤层蛋白和内核膜上的整合膜蛋白之间相互作用；另一种是通过核纤层蛋白多肽链与在核内膜上的法呢基脂基团发生相互作用。

在植物基因组中没有编码的核纤层蛋白，但是植物中可能包含其他与动物核纤层蛋白功能相似的结构蛋白。酵母（如啤酒酵母和非洲栗酒酵母）和其他一些单细胞真核生物缺少核纤层蛋白，因此没有核纤层。为什么是这样的？至少有两种可能的原因，重要

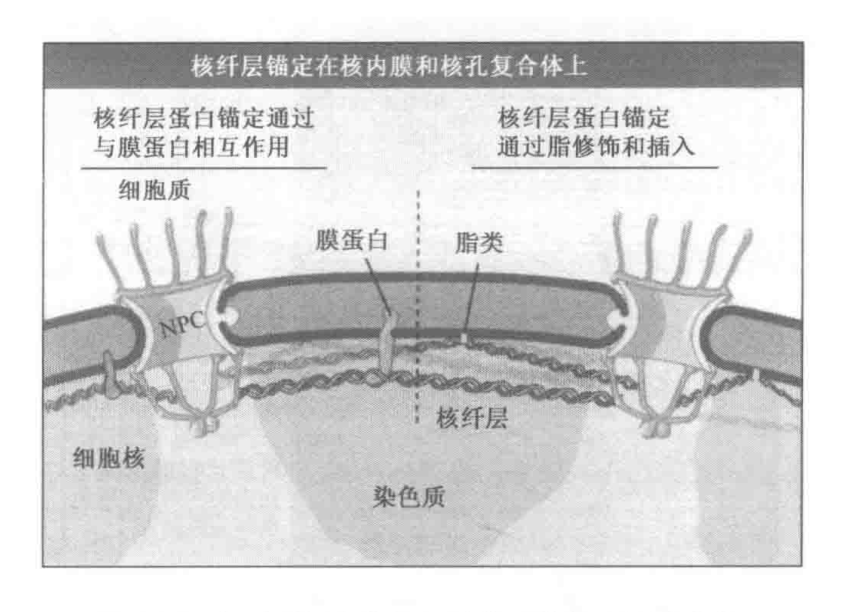


图 5.12　核纤层锚定在核内膜的两种相互作用形式。

的区别基于酵母细胞的小细胞核（直径约 1μm）和多细胞生物的大细胞核（在直径上平均 10μm）。第一种原因是酵母细胞进行封闭的有丝分裂，而核被膜在整个过程保持完整。相反的，在多细胞的真核生物细胞中，核被膜在有丝分裂早期就解聚。在染色体分离之后，围绕着每套染色体形成新的核被膜，在此时重建核组织的过程中，认为核纤层起着重要作用。第二种原因，核纤层可能为多细胞生物的更大的核被膜提供基本的结构支持（有丝分裂中核纤层蛋白的作用的细节见 11.10 有丝分裂中发生许多形态学上的变化）。

核纤层除了在细胞核重建和结构支持上的作用外，核纤层与染色质相互作用，并且可能是 DNA 复制发生所需要的。一个关于在 DNA 复制时核纤层的作用来自下面的实验，当精子染色质加入光滑非洲爪蟾卵子抽提物时，核被膜在精子染色质周围形成，如图 5.13 所示。这些核增大，精子细胞核中染色体高度压缩、解压缩（这种解压缩模仿了精子染色质在卵母细胞中遇到特定因子时的受精过程）。在这些细胞核中的 DNA 然后被复制。在这些抽提物中含有丰富的核纤层蛋白和 LAP。如果通过抽提物与核纤层蛋白抗体共孵育，从而从这些抽提物中去除核纤层蛋白，核被膜依然包围在精子染色质外围。但是，这些细胞核是小而脆弱的，并且不发生 DNA 复制。这些结果表明，核被膜可能对于染色质的组织是重要的，从而可以被复制。

细胞脆弱性的增加与中间纤维蛋白的突变有关。核纤层蛋白和 LAP 的突变与几种遗传疾病相关，主要影响肌肉。这些疾病被称为核纤层蛋白病。一种可选择的改变核纤层的方法表现，那就是使细胞核更加脆弱和易感伤害。肌肉细胞可能比其他细胞类型更易受影响，这是因为肌肉细胞正常的收缩会暴露出它们的细胞核，与其他组织相比承受更大的机械压力。

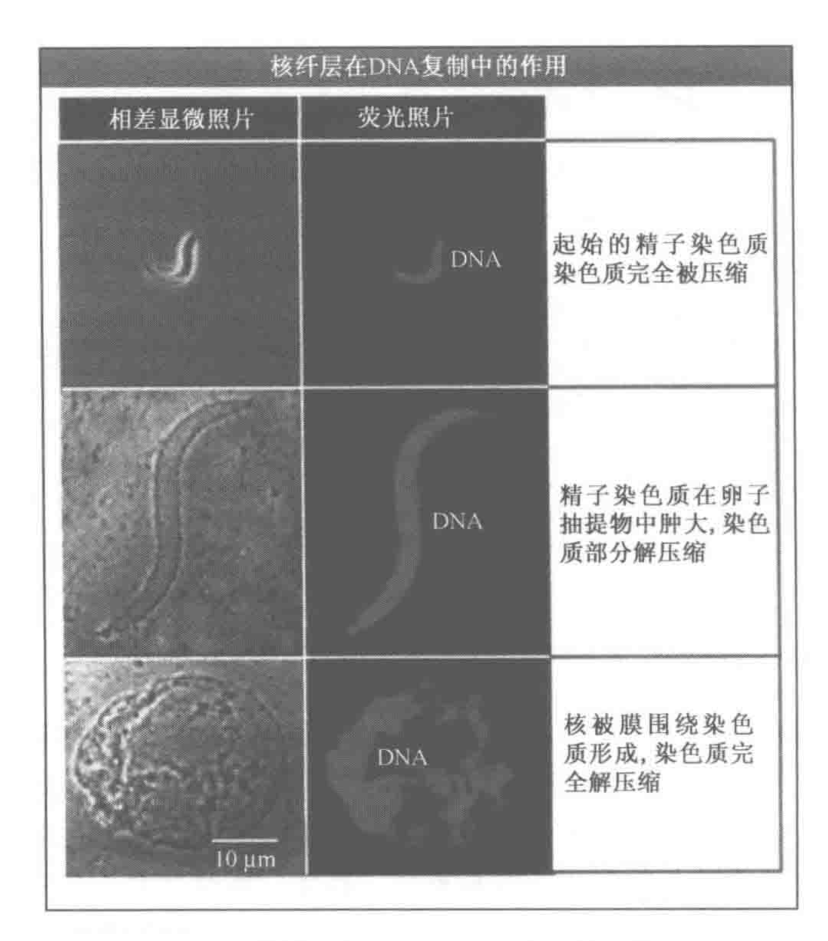


图 5.13　当来此非洲爪蟾精子的细胞被解膜（移去质膜）与卵子抽提物共培养，染色质解压缩，功能性核被膜形成，围绕染色质。荧光图像显示 DNA 的定位。照片由 California 大学 San Diego 分校的 Douglass Forbes 惠赠。

5.8　大分子在细胞核和细胞质之间主动运输

关键概念

- 不带电荷，分子质量小于 100Da 的分子可以穿过核被膜。
- 分子质量大于 100Da 的分子和大分子通过核孔复合体运输穿过核被膜。
- 直径达 9nm 的粒子（相当于球蛋白，分子质量达 40kDa）可以通过被动扩散穿过 NPC。
- 更大的大分子通过 NPC 主动运输，但必须包含特定的信号。

不带电荷、分子质量小于 100Da 的分子，包括水，可以通过磷脂双层自由地扩散，但是其他所有的要穿过核被膜运输的分子和大分子，都要通过核孔复合体。通过核孔复合体的过程被称为转运。图 5.14 表明，不同类型的分子通过 NPC 入核或出核。

细胞核和细胞质之间的分子（分子质量大于 100Da）和大分子的运动，可以通过放射性标记或荧光染料标记来研究。这些分子可被注射到细胞质或非常大的细胞的细胞核中，如两栖动物的卵母细胞。细胞中放射性标记的复合物的定位通过亚细胞的分离而监控追踪，而荧光染料标记的分子的定位是通过荧光显微镜方法检测的。利用这些技术的研究表明，相对小的分子，如葡萄糖-6-磷酸和荧光素，通过核被膜的速度相当快，只

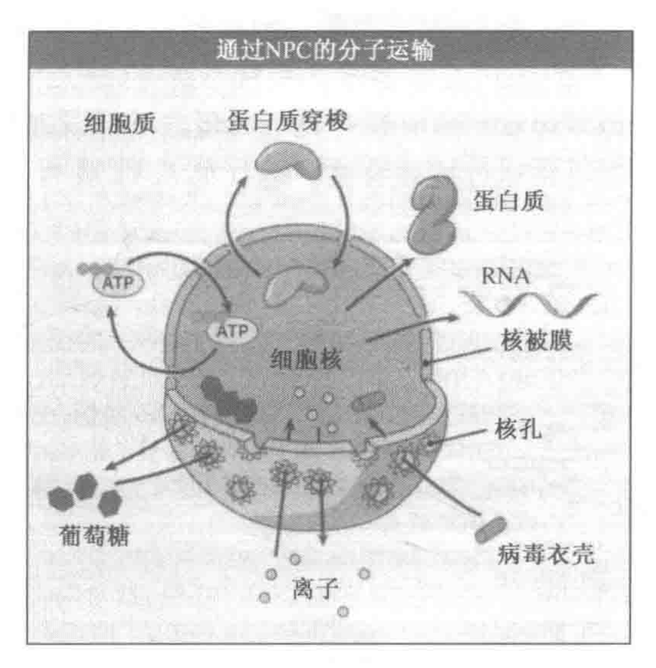


图 5.14 许多不同类型的分子和大分子通过 NPC 运输。小的、不带电荷的、分子质量小于 100Da 的分子通过核被膜扩散。

在几秒内。在平衡状态，这些类型的小分子的浓度在核被膜的两侧是相同的。我们相信这些小分子运动通过简单的扩散，因为它发生在 4℃ 的生理学温度。与蛋白质相关的运输功能非常少或者根本不在 4℃，然而在 4℃ 和生理学温度时，扩散速率几乎相等。

自由扩散穿过核被膜的最大粒子的体积检测，可通过在核被膜的一侧注入精确大小的金粒，在另一侧分析检测它们的运动能力。如图 5.15 所示，这些研究的总体评价是，直径为 9nm 的粒子或者更小一些的粒子，可以通过核孔被动扩散输入或输出细胞核。这个直径相当于大约 40kDa 的球蛋白。因为扩散的速率和分子大小成比例，进出核的扩散速度大分子比小分子要慢。扩散的速率在两个方向是相同的。

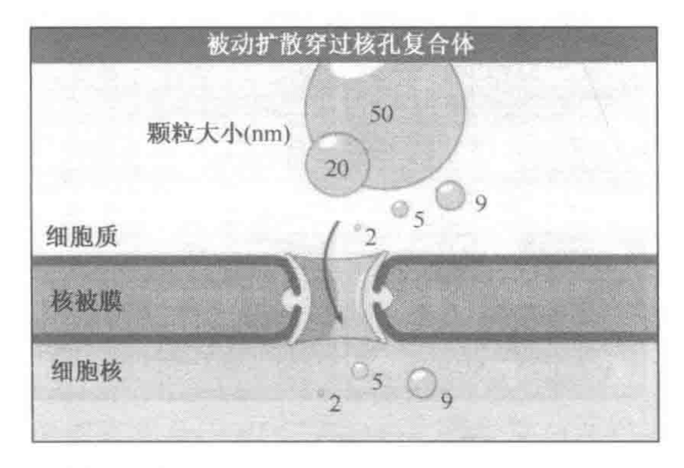


图 5.15 当聚乙烯吡咯烷包裹的不同大小的金颗粒注射入细胞时，这些小于 9nm 的颗粒就可通过被动扩散穿过 NPC。

尺度大于 9 nm 的蛋白质很难以自由扩散的方式通过核孔；这些蛋白质被有选择地主动运输。这一结论来自不同大小的蛋白质注入到细胞质的研究。这些研究表明，只有一些蛋白质可被输入细胞核，它们的输入速率与它们的大小不成比例。从细胞核内输出

的蛋白质同样具有这些性质。这些研究表明，细胞核输入和输出蛋白质是有选择的过程。输入和输出对于 ATP 的损耗是敏感的，并且不在 4℃ 发生，这暗示着转运是一个能量依赖的过程。如后面的讨论，只有某一类型的蛋白质可以进入和离开细胞核的原因是它们必须包含信号以便可以通过核被膜被转运（见 5.11 蛋白质通过核孔选择性运入细胞核）。

5.9 核孔复合体是双向通道

关键概念

- NPC 是对称的双向结构，它位于内外核膜融合的部位。
- 人类细胞中每个核孔复合体的分子质量约为 120×10^6 Da，是核糖体的 40 倍，由约 30 种蛋白质的多拷贝组成。
- 核孔复合体包含伸向胞质的纤维和一个伸向细胞核的核篮结构。

核被膜上的 NPC 是唯一连接细胞核和细胞质的通道。人类细胞中的 NPC 分子质量估计约为 120×10^6 Da，外部直径约为 120nm。总的来说，核孔复合体的质量约为真核细胞中核糖体质量的 40 倍。核孔复合体由约 30 种不同的多肽的多拷贝组成（见 5.10 核孔复合体由核孔蛋白组成）。相反，核糖体包含四种 RNA 的单拷贝和约 80 种不同的多肽。

NPC 的结构类似于桶状，这种结构横跨核被膜，镶嵌在双层膜上，形成一种环状的结构。图 5.16 和图 5.17 显示，NPC 的胞质面和核质面看上去完全不同。NPC 中延伸到胞质和核质的部分称为端结构。NPC 胞质面的端结构向外散发出 8 条相对短的纤维，这些短纤维向胞质伸入约 100nm。细胞核面的端结构是由相似的纤维组成一个环。这种端结构被称为核篮，或者称为“捕鱼笼”。在多细胞有机体的一些细胞中，额外的

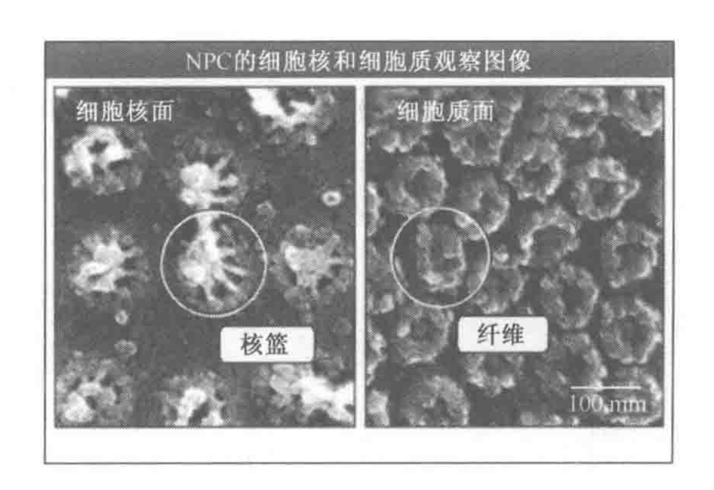


图 5.16 NPC 端结构的不同。通过电子显微镜可观察到，细胞核面是篮状结构（左图）而胞质面是纤维（右图）。图片复制自 *J. Struct. Biol.*，vol. 140，Fahrenkrog，B.，et al.，Domain-specific Antibodies …，pp. 254-267. Copyright 2002，获得 Elsevier 许可。图片由 Basel 大学的 Ueli Aebi 惠赠。

纤维从篮状结构深入到细胞核的内部区域。细胞质和细胞核两侧的端结构是被转运分子首先与核孔复合体相互作用的部位，分子在通过NPC通道转运之后，又与NPC发生最后作用的部位（见5.11蛋白质通过核孔选择性运入细胞核）。

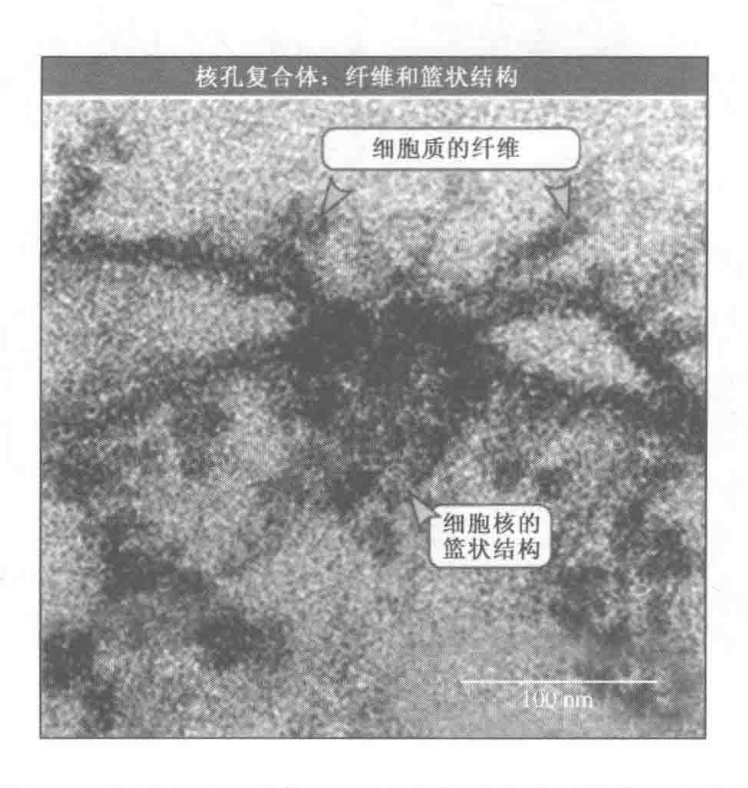


图5.17 通过电子显微镜可见核孔中的胞质面纤维和细胞核面的篮状结构。图片复制自 *The Journal of Cell Biology*，1998，vol. 143，pp. 577-588，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。图片由 Basel 大学的 Ueli Aebi 惠赠。

通过分析数百个NPC的高清晰度电子显微镜照片，得到了NPC的模型。利用数学方法叠加和平均处理这些图像，得到一个平均的电子密度图或NPC中心的大致结构（这种方法还没有解析端结构）。图5.18显示了酵母和爪蟾NPC中心的模型。酿酒酵母和其他单细胞真核生物的NPC大约有60×10^6 Da，是多细胞有机体NPC质量的一半。虽然它们的大小不同，但整体结构是保守的。在NPC中心通道的大小或其转运的特性上，多细胞动物和酵母的NPC相似。目前得到的最好的NPC的图像是通过低温电子显微术获得的。

如图5.19所示，不论NPC被定位在什么位置，内核膜和外核膜都会融合。NPC位于一个通过膜融合获得的孔内。我们不知道膜融合是怎么发生的，但可能是在核被膜上装配NPC过程的一个整合部分。NPC通过中心结构部分的整合膜蛋白被锚定在核被膜上。这些蛋白质延伸到核被膜的膜腔内。NPC穿过核纤层并且锚定在核纤层上。

通过许多研究得到NPC的复合模型，NPC是由许多环状和辐射状的结构交织在一起形成了复杂的形式。NPC由模块组成，在扫描电镜下观察到的各种亚结构与这一观点一致，这便产生了这些亚结构是如何组装的一个模型。然而，我们仍然不能确定这些模块组分是准确地契合在一起。同时我们对于NPC的组装过程也知之甚少。

在物质通过NPC的时候，通过固定捕获可看见物质是很有可能的。当通过电子显

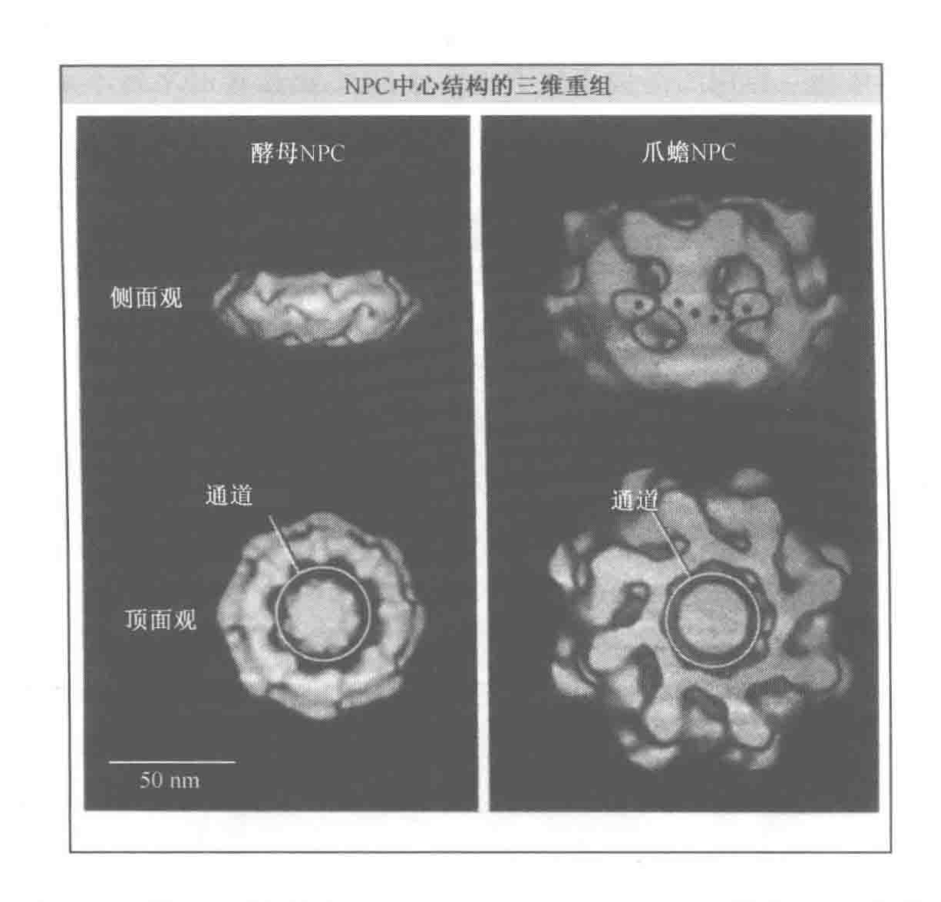


图 5.18 利用计算机技术将平均的电子密度图显示为三维模型。这些模型是从核被膜的平面显示（侧面观）和从核被膜的上部显示（俯视）。图片复制自 *Gurr Opin Cell Bid* vol. 11，Frenkrog，B.，et al.，The Nuclear Pore…，pp. 391-401. Copyright 1999，获得 Elsevier 许可。图片由 Basel 大学的 Ueli Aebi 惠赠。

微镜检测 NPC 时，经常可以看见电子密度物质填满中央通道，如图 5.18 所示。关于这种物质的属性存在争议。另一种看法是部分 NPC 与大多被转运的物质有亲密的接触。术语“运输器”或“栓”就是基于这个理念。另一种可能的观点是电子密度物质事实上代表了物质-受体复合物。基于高清晰电子显微图片，这种物质有一个宽范围的大小，并且定位于 NPC 通道内，与这种观点一致的一个发现是这种物质组成了物质-受体复合物。

在一些细胞，NPC 不仅存在于核被膜上，还存在于称为环状片层的结构中。环状片层结构是存在于胞质中的包含有 NPC 双层膜的堆叠。通常 NPC 在环状片层的多个层面上是排列成行的，如图 5.20。环状片层在脊椎动物和无脊椎动物的卵母细胞中是最常见的，但是在其他类型的细胞中环状片层也可观察到。它们的起源和功能还不清楚。从核被膜上分离哺乳动物的 NPC 是很困难的，因为它们总是贴附在核纤层上，而核纤层非常难溶解和处理。因为环状片层缺少核纤层，所以它是生物化学和细胞学中研究 NPC 的有价值的来源。环状片层上的 NPC 与核被膜上的 NPC 有相同的结构和成分。

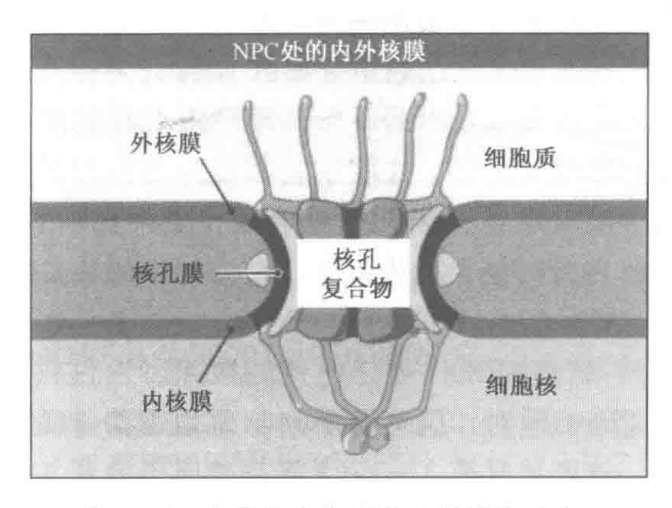


图 5.19 核孔复合体处的内外核膜融合。

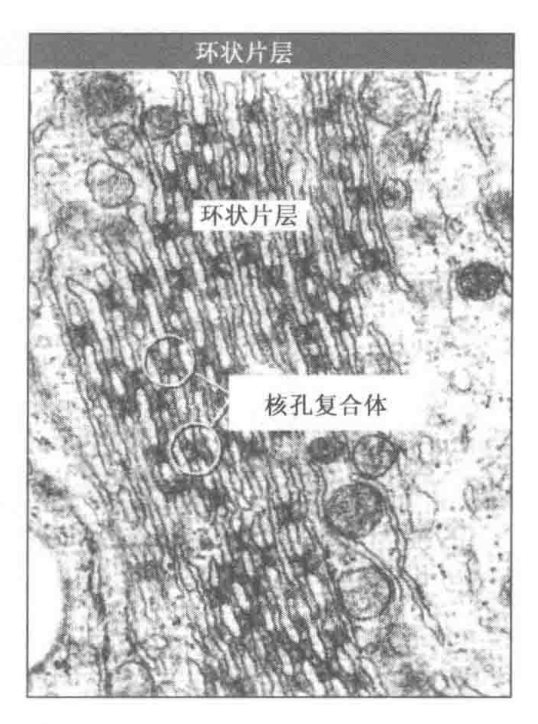


图 5.20 透射电镜中观察到的爪蟾卵母细胞的环状片层。图片由 Don W. Fawcett 博士提供。复制自 *The Cell*，1981。显微图片由阿根廷布宜诺斯艾利斯儿童医院内分泌科的 Héctor E. Chemes 惠赠。

5.10 核孔复合体由核孔蛋白组成

关键概念

- NPC 中的蛋白质被称为核孔蛋白。
- 许多核孔蛋白包含短序列的重复，例如 Gly-Leu-Phe-Gly、X-Phe-X-Phe-Gly、X-X- Phe-Gly，这些短序列的重复在转运过程中与转运因子相互作用。
- 一些核孔蛋白是跨膜蛋白，这些跨膜蛋白将 NPC 锚定在核被膜上。
- 已鉴定出酵母 NPC 的所有核孔蛋白。
- NPC 在有丝分裂时解聚和重组装配。
- 一些核孔蛋白处于动态中：它们迅速结合又迅速地从 NPC 脱离。

组成 NPC 的蛋白质称为核孔蛋白。我们对于核孔蛋白的了解几乎都来自面包酵母和酿酒酵母，并且认为所有的酵母核孔蛋白都已经被鉴定。鉴定整套酵母核孔蛋白的方法主要有两种。第一种是遗传学方法，分离细胞核转运的突变缺失体，另一种是生物化学的方法，包括从分离的核被膜中纯化 NPC。酵母的核纤层缺失促使酵母 NPC 溶解（见 5.7 *核纤层在核被膜之下*）。通过电泳分离蛋白质，如图 5.21，并利用质谱分析做进一步鉴定。运用遗传学和生物学方法已经鉴定了大约 30 种蛋白质。

多细胞动物中的核孔蛋白，尤其是两栖类和哺乳动物中的核孔蛋白，也已经被鉴

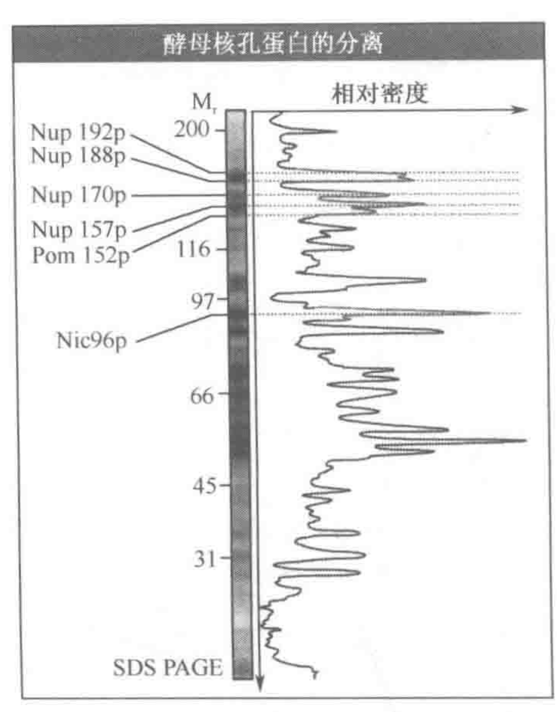


图 5.21 NPC 可从哺乳动物核被膜中纯化分离，核孔蛋白可以通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。左图为染色的凝胶，右图为凝胶光密度踪迹测定。含量丰富的核孔蛋白已被标出。图片复制自 *The Journal of Cell Biology*，1995，vol. 131，pp. 1133-1148，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。图片由 Rockefeller 大学的 Michael Rout 惠赠。

定。虽然多细胞动物的 NPC 在质量上大约是酵母的两倍，但是不同核孔蛋白的数量几乎是相同的。将遗传学方法应用于脊椎动物有一定困难，所以它们的核孔蛋白是通过生物化学和免疫学的方法鉴定出来的。环状片层上缺少核纤层从而便于从爪蟾中分离出 NPC。

许多核孔蛋白的一个共同特征就是具有多个短序列的重复。这些重复被认为是在转运过程中被转运分子与 NPC 结合的位点。大约 1/3 的核孔蛋白包含这些重复，它们的序列是 Gly-Leu-Phe-Gly、X-Phe-X-Phe-Gly、X-X- Phe-Gly，这里的 X 代表任何氨基酸。因为它们包含 Phe-Gly 对，这些短序列常常被称为 FG 重复。这些重复被 3～15 个氨基酸间隔分开。总体来说，包含 FG 重复的核孔蛋白拥有 10～30 个重复，但也有一些核孔蛋白只有 1 或 2 个重复。具有很多 FG 重复的核孔蛋白，其重复共同存在于一些蛋白质的某一个蛋白质上。FG 重复作为转运受体的引入位点排列在 NPC 的中央通道。其他包含 FG 重复的核孔蛋白是胞质纤维和核篮的组分。值得注意的是，从酵母的核孔蛋白中删除大量的 FG 重复区域不影响细胞的生存。在特殊情况下，可以完全删除位于纤维丝和核篮中的重复区域，然而在不危及细胞生命时，只有少量的位于中央通道的 FG 重复可以被删除。

许多核孔蛋白的另一个特征是存在一个蛋白结构功能域，称为卷曲螺旋。卷曲螺旋区域是特殊类型的 α 螺旋，α 螺旋的主要功能是与其他的卷曲螺旋结构域相互作用，从而形成一个多聚体结构。卷曲螺旋的交互作用可能对 NPC 的整体结构非常重要。

我们开始了解 NPC 中核孔蛋白是如何组织的。利用生物化学的分离方法来分离 NPC 的亚复合体，并且确定亚复合体中各组分的身份。这一分析揭示了核孔蛋白之间的相互作用。利用免疫电子显微技术可以测定 NPC 中的一个特定核孔蛋白的定位。这种方法是利用结合了金粒的抗体来检测特殊的核孔蛋白。这些研究告诉我们哪些核孔蛋白定位于胞质纤维，哪些定位于核篮或中央结构上。大多数的核孔蛋白在核孔的细胞核侧和胞质侧都有分布，只有很少的核孔蛋白分布在一侧的端结构上，见图 5.22。

多细胞动物和酵母的 NPC 中有少量的核孔蛋白是跨膜蛋白。有三个观察结果支持这一结论：

- 免疫电子显微图显示了这些核孔蛋白定位于距离孔膜很近的位置。
- 这些核孔蛋白有疏水氨基酸长链横跨脂质双层。
- 用高盐处理分离核被膜后仍可鉴定到这些核孔蛋白，高盐处理后只留下整合膜

蛋白的一些蛋白质。

这些跨膜核孔蛋白将 NPC 锚定在核被膜上。

图 5.23 中的模型展示了酵母 NPC 的不同位点上相对丰富的核孔蛋白。有些核孔蛋白比其他的核孔蛋白更加丰富。因为 NPC 有 8 个折叠对称，我们认为每个 NPC 上没有少于 8 个拷贝的核孔蛋白，并且许多类型有 16、32 或更多的拷贝。数量最少的核孔蛋白被发现在胞质纤维和核篮中。我们可以利用每个核孔蛋白的分子质量和丰度来确定酵母 NPC 的总分子质量。计算的总分子质量与通过电子显微技术测得的 6×10^7Da 的整体大小一致（见 5.9 核孔复合体是双向通道）。

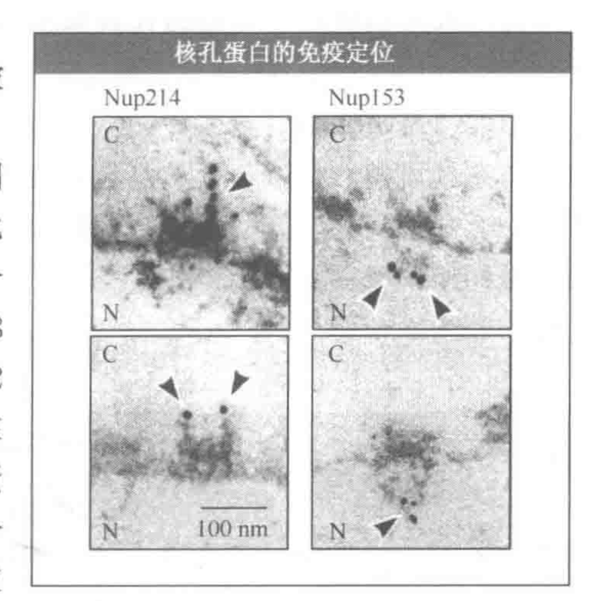


图 5.22 NPC 中的每个核孔蛋白可以通过免疫电子显微镜定位。图片复制自 *The Journal of Cell Biology*，1998，vol. 143，pp. 577-588，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。图片由 Basel 大学的 Ueli Aebi 惠赠。

实验表明，一些核孔蛋白稳定地与另一个蛋白质相结合，而另一些则是处于动态中。这些研究是利用光漂白后倒置荧光恢复技术进行的。这种方法中哺乳动物细胞表达利用带有 GFP 标签的核孔蛋白。核被膜的一小圈面积被光漂白，并测量在漂白位点的 NPC 荧光恢复动力学。这些研究表明大约一半的核孔蛋白是稳定结合的，并且这些蛋白质是组成 NPC 的框架成分。其他的核孔蛋白有几小时的停留时间，而少量其他的核孔蛋白处于高度动态中，它们与 NPC 结合几分钟或更短的时间。

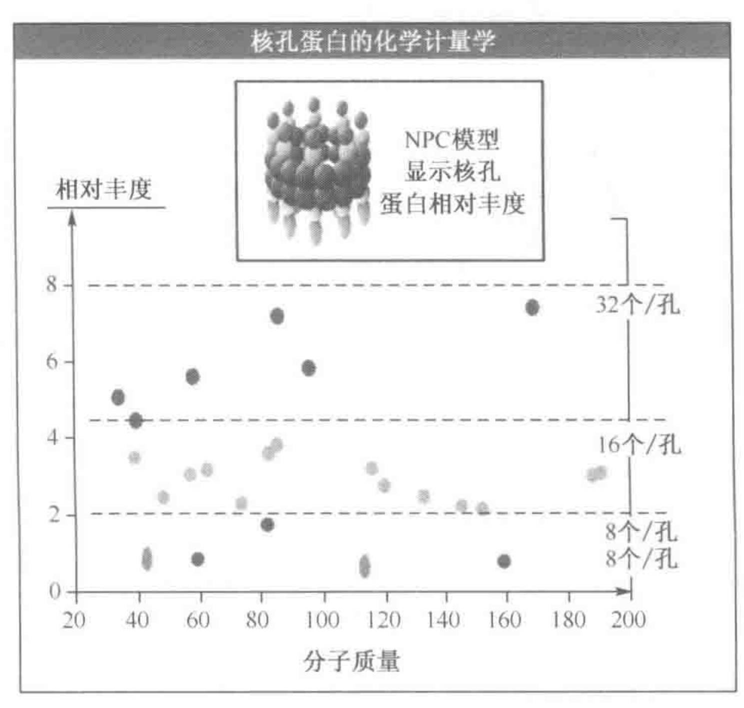


图 5.23 基于凝胶电泳可以计算出每一种核孔蛋白的相对丰度。模型显示了定位在 NPC 不同部位的核孔蛋白的相对丰度。只有位于端结构中的核孔蛋白是不对称分布的。照片复制自 *The Journal of Cell Biolgy*，2000，vol. 148，pp. 639-651，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

在一些生物体中，核被膜在有丝分裂时解聚，NPC 解聚成亚复合体。当核被膜在有丝分裂晚期形成时 NPC 又重组装配。在体内解聚和重组的过程都少于 1h。重组过程中的不同阶段可以通过电子显微镜观察，整个重组过程经过多次、可重复的步骤。关于重组装配的机制和是否蛋白质组装核孔来帮助装配 NPC，目前还知之甚少。在新的核孔蛋白合成的间期，新的 NPC 也同样形成。我们还不清楚重新（*de novo*）组装与解聚是否是同样的机制。

5.11 蛋白质通过核孔选择性运入细胞核

关键概念

- 成熟的细胞核蛋白包含为其细胞核定位所需的序列信息。
- 蛋白质通过核孔选择性进入和离开细胞核。
- 入核信号占据转运蛋白的一小部分。

所有的大分子进入和离开细胞核都是通过核孔的大型通道。图 5.24 表明了某些运输蛋白的运动速率。

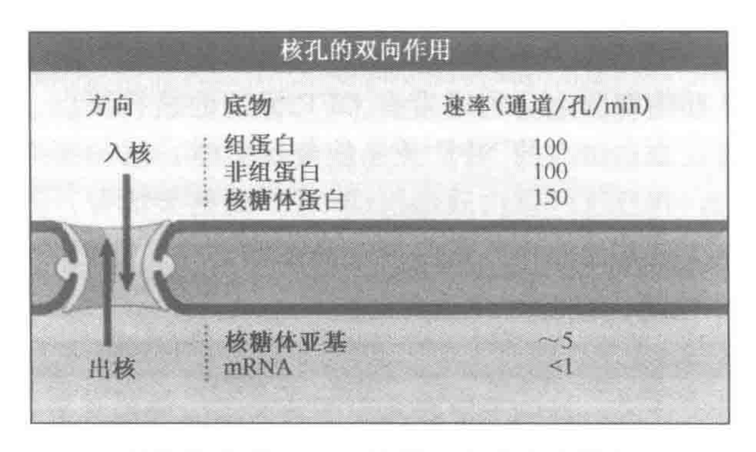


图 5.24 一些生物大分子通过核孔时入核和出核的速率。速率主要反映了每个蛋白质的存在和需要被运输的相对数量。

进入细胞核的过程始于运输蛋白与伸入到细胞质的 NPC 纤维结合。这个过程通过使用电子显微技术跟踪通过核孔复合体的蛋白质的运动步骤观察。高电子密度的金粒被细胞核蛋白包裹，被注入一个卵母细胞的细胞质中，它们在细胞核中积聚。一些蛋白质在胞质纤维上或者在 NPC 的通道内排列在一起。

运输蛋白与 NPC 的结合（docking）是非能量依赖的过程，但是转运是能量依赖的。当细胞在低温下培养或经过处理来阻断能量依赖过程，蛋白质包裹的金粒依然与 NPC 的胞质成分相结合，但在 NPC 的通道或细胞核中不存在。

蛋白质通过 NPC 是高选择性的（见 5.8 *大分子在细胞核和细胞质之间主动运输*）。在很多情况下，被转运蛋白质包含定位于细胞核的信息。没有定位信号的蛋白质也可以通过与有这种定位信号的蛋白质结合而被运输。从爪蟾卵母细胞分离细胞核蛋白并把蛋白质注入到卵母细胞的细胞质中，可以很好地证明细胞核蛋白包含入核信号。被注入的蛋白质很快地进入细胞核，从而表明他们包含进入细胞核的转运信息。

这个实验还表明，不像大多数转运进入内质网的信号序列，当蛋白质进入核内后，细胞核的定位信号也不被去除。核蛋白再次转运的能力是重要的：当一个细胞分裂时，核被膜解聚，并且核蛋白分散在整个细胞中。有丝分裂之后蛋白质必须再次被输入新形成的细胞核。

Laskey 的经典实验首次表明，细胞核定位的序列信息占据一个蛋白质的一小部分。实验运用核质蛋白（一种含量丰富的细胞核蛋白）进行。当核质蛋白被注入到爪蟾卵母细胞的细胞质中时，核质蛋白在细胞核内迅速地凝聚（见图 5.25）。因为细胞核中已经包含大量的核质蛋白，新注入的蛋白质积聚从而减少浓度差。核质蛋白是一个分子质量为 33kDa 的相对小的蛋白质，但它通常形成五聚体，使它的总分子质量接近 150kDa，因此，由于其分子质量太大，而无法扩散进入细胞核。

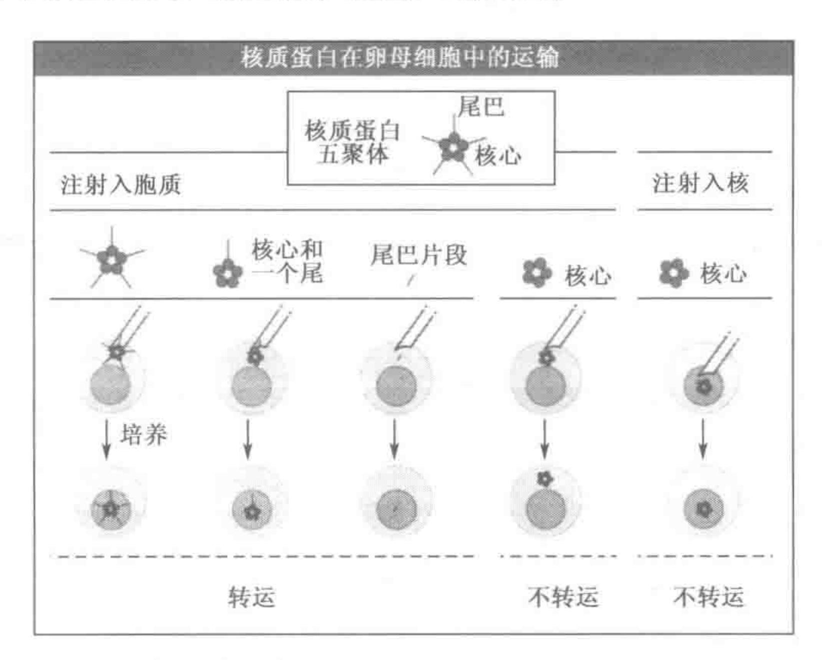


图 5.25 将核质蛋白注入爪蟾卵母细胞的细胞质和细胞核，从而显示 C 端尾巴在入核过程中的重要性。

为了检测入核信号只是蛋白质的一小部分，用蛋白酶将核质蛋白五聚体切成两部分，一个来自单体 C 端的 10 kDa 的“尾巴”，以及一个包含单体剩余的 100 kDa 五聚物的“核心”。如图 5.25 所示，将核质蛋白的不同部分注入到爪蟾卵母细胞中来检测它们是否包含核转运信息。当“核心”被注入到细胞质中时，它不能进入细胞核。因此，“核心”不包含入核信号。但是，将“核心”直接注入到细胞核中，“核心”停留在核内，并且不会渗透回到细胞质。单独的尾巴片段从细胞质运动到细胞核，并且停留在核里。用蛋白酶局部处理，导致“核心”保留一个或更多的尾巴。单个尾巴的存在足以使“核心”直接进入细胞核。

这些实验的结果得出结论，核孔是一个选择性通道，它只允许在氨基酸序列上携带有正确信号的蛋白质进入。细胞核的转运信号只占据蛋白质的一小部分——以核质蛋白为例，入核信息位于 10 kDa 的 C 端尾巴。除此以外，简单的扩散和在细胞核内的停留不足以使一个蛋白质从胞质转运进入细胞核内。位于细胞核内的五聚物“核心”实验阐明，五聚体的“核心”可以位于细胞核内，但不能在核中自己聚集起来。

5.12 细胞核定位序列使蛋白质定位到细胞核

关键概念

- 细胞核定位序列（NLS）通常是基本氨基酸的一个短链。
- NLS是入核过程的充要条件。

一个蛋白质中由氨基酸构成的短链结构能够使该蛋白质定位于细胞核，这种短链氨基酸序列称为核定位信号（NLS）。NLS普遍都含有基本氨基酸——赖氨酸和精氨酸。病毒核蛋白SV40大T抗原中的NLS特征很明显。当SV40病毒侵染细胞时，大T抗原在细胞质中合成，并移入细胞核以促进病毒的繁殖生长。大T抗原利用宿主细胞细胞器（machinery）进入细胞核。

SV40的大T抗原的NLS在氨基酸126和132位之间有序列Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val，如图5.26所示。NLS的发现基于两类实验。一个实验是，将T抗原上128位上的赖氨酸突变为苏氨酸，结果导致蛋白质不能进入细胞核，这是因为NLS失活了。NLS以外的氨基酸突变不影响蛋白质入核的转运。这些结果表明NLS对于蛋白质的细胞核内定位是必需的。第二个实验是，最小的NLS的一个对应肽段可以与正常的非核蛋白相连，导致嵌合蛋白被输入到细胞核内。带有突变NLS的嵌合蛋白不被输入核。

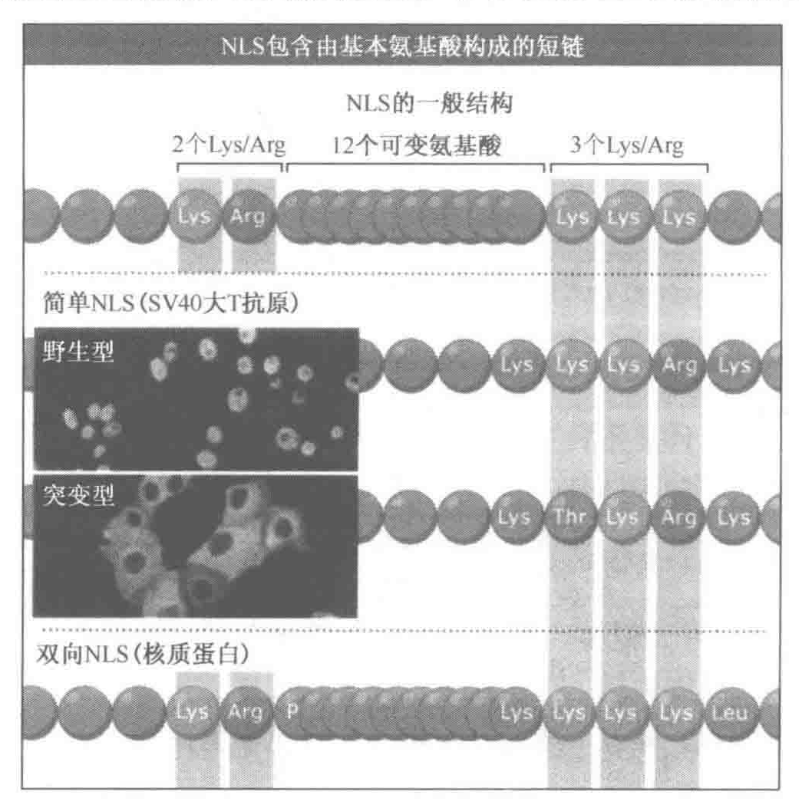


图5.26 SV40大T抗原中的NLS只有一条由基本氨基酸构成的短链，NLS上的赖氨酸突变成苏氨酸的单氨基酸变异导致SV40大T抗原不能进入细胞核。核质蛋白的NLS是双向NLS的一个实例，两个保守区域被12个可变氨基酸隔开。图片复制自*Cell*，vol. 39，Kalderon，D.，et al.，A Short Amino Acid…，pp，499-509。Copyright 1984，获得Elsevier许可。图片由Daniel Kalderon惠赠。

这些结果表明 NLS 对于核输入是充分条件，可称为 NLS 的氨基酸序列，它对于入核转运必须满足必需和充分这两个条件。

许多核蛋白包含有类似于 T 抗原 NLS 的短的基本的 NLS。另一种 NLS 的普遍类型包含两条短的基本氨基酸序列，它们被 12 个可变的氨基酸分隔开；这种 NLS 称为双向 NLS，它存在于核质中（见图 5.26）。这两种类型的 NLS 称为“经典的” NLS，在蛋白质转运中被相同的转运蛋白识别。但是，仍然有其他一些类型的 NLS，它们没有确切的定义，但是它们也大致包含基本的氨基酸。所以，类似分泌信号序列，NLS 拥有某些基本的特征，但不具有精细的序列要求。

5.13 细胞质 NLS 受体介导细胞核蛋白进入细胞核

关键概念

- 入核受体是结合到运输蛋白 NLS 上的胞质蛋白。
- 入核受体是蛋白质大家族的一部分，常称为核转运蛋白家族。

入核蛋白的运输是受体介导的过程。实验表明蛋白质入核是可饱和的，暗示着入核涉及识别核定位信号的受体。实验检测了爪蟾卵母细胞中的入核运输动力学，如图 5.27 所示。包含 NLS 的短肽与通常的非核蛋白牛血清白蛋白（BSA）化学交联。将 NLS-BSA 注入到卵母细胞质中，它进入到细胞核中，而单个 BSA 仍保留在细胞质中。随着 NLS-BSA 浓度的增加，输入的程度趋于饱和。这与存在一个限制因子（或很多因子）识别 NLS 并介导入核的观点相一致。这就暗示着一个可识别包含 NLS 的受体的存在。

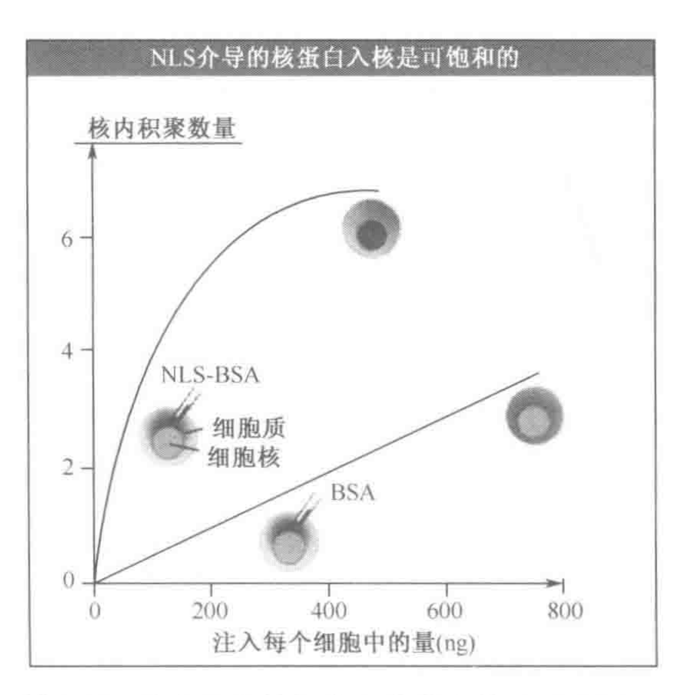


图 5.27 注入到卵母细胞细胞质中的 NLS-BSA 入核过程是可饱和的。

我们现在知道 NLS 受体是可溶解的胞质蛋白。一些 NLS 受体起初是利用一个体外

实验鉴定的，这些体外实验概括了在细胞中发生的现象，并且可以纯化胞液因子。在这个实验中，如图 5.28，用去垢剂洋地黄皂苷处理质膜后，使其具有渗透性。这使胞质物质通过质膜上的孔脱离出来，但是洋地黄皂苷不影响核被膜。当包含 NLS 的蛋白质被加入到这些有渗透性的细胞中，它们通过质膜上的孔进入细胞，但是它们不能进入细胞核，除非含有胞质抽提物。

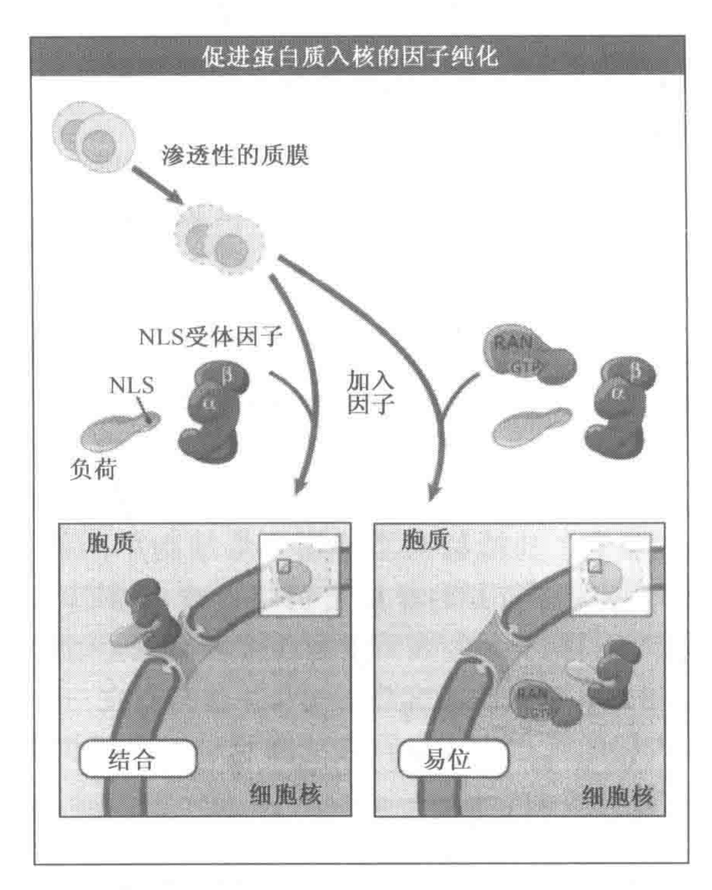


图 5.28 半渗透性细胞用于纯化入核过程中蛋白质正确转运所必需的细胞质蛋白。

如图 5.28 所示，胞质抽提物有两种不同的活性，其一是将运输蛋白、核孔和另一个支持迁移的蛋白质结合在一起。因此，核蛋白入核可分为两个步骤：

- 核孔处依赖 NLS 的结合（停泊 docking），之后
- 迁移进入核质。

促进结合活性的物质是 NLS 受体。这种受体伴随着运输物质通过 NPC，在细胞核内释放运输物质，之后再回到细胞质继续另一轮的转运。通过 NPC 增强迁移活性的物质是 Ran GTPase。

已经鉴定了两种类型的 NLS 受体：

- 可以直接结合到核孔上的 NLS 受体。
- 核孔上需要其他的特殊受体介导结合的 NLS 受体。

如图 5.29 所示，最简单的 NLS 受体由单体蛋白质组成，它结合在运输物质的 NLS 和核孔上。这些 NLS 受体与 β 输入蛋白关系密切。相反，异二聚体 NLS 受体包括与运输物质结合的亚基和与核孔蛋白结合的亚基。上述的第一种 NLS 受体是由 α 输入蛋白和 β 输入蛋白组成的。α 输入蛋白的大小约为 55～66kDa，它与 NLS 直接结合。数

量众多的蛋白质都带有典型的 NLS，它们将 α 输入蛋白作为特殊的受体，它们允许带有 β 输入蛋白的许多运输蛋白被转运。β 输入蛋白大约 90kDa 并与 α 输入蛋白在核孔上结合。α 输入蛋白是很多种蛋白质中可识别 NLS 并与 β 输入蛋白相互作用的一种蛋白质。

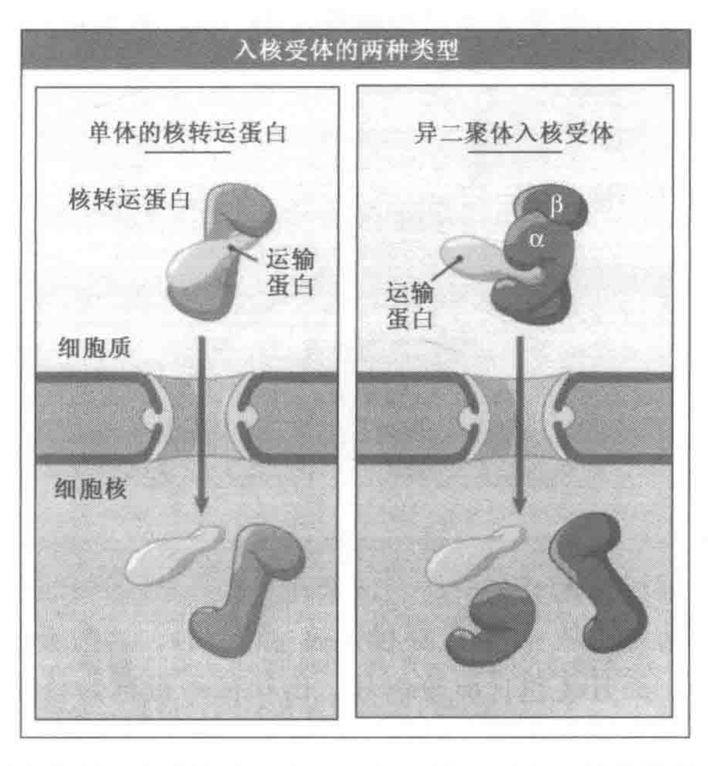


图 5.29 许多运输蛋白通过与 β 输入蛋白相关的核转运蛋白结合而进入核内（左图）。另外的运输蛋白利用 αβ 输入蛋白的异二聚体进入核内（右图）。

带有 SV40 NLS 的 α 输入蛋白的三维空间结构具有两个结合 NLS 的空间。这解释了为什么单向和双向 NLS 可与相同的受体发生作用（见图 5.26）。三个关键的氨基酸连在一起与 NLS 上第三个赖氨酸作用，使这个赖氨酸成为正确结合 NLS 的最重要的残基。这解释了在 NLS 起始序列上可以有轻微的变化，但是第三个赖氨酸的单个氨基酸突变会导致 NLS 功能的完全丧失（见 5.12 细胞核定位序列使蛋白质定位到细胞核）。

核转运蛋白复合体与 NPC 胞质部分结合后，穿过核孔通道，但是这一过程的机制还不清楚。需要更进一步的研究确定在转运过程中核孔蛋白与复合体发生多少次的连续作用，以及通过什么机制向前运动。穿过核孔的两个运动模型在 5.16 基于细胞核转运机制提出的多样模型中讨论。

一些运输蛋白在它们的入核过程中利用不止一个核转运受体，来确保有效的输入和（或）给细胞提供另一个水平的调控。此外，不是所有的蛋白质都通过核转运蛋白输入到细胞核中。一些蛋白质，如信号分子 β-catenin，与任何转运子一同分配并且简单直接地与核孔蛋白相互作用从而入核。目前对于为什么有些蛋白质不依赖于核转运蛋白被转运仍不清楚，但反映了独立于核转运之外的运输是需要调控的。

一些病毒蛋白已经适应它们自己的核转运因子与核孔蛋白和细胞转运子接触。例如，病毒蛋白 Vpr，它是 HIV 感染不分裂细胞所必需的，它与 α 输入蛋白和核孔蛋白

结合来促进病毒遗传物质进入到细胞核中。因此，Vpr 模仿了 β 输入蛋白在细胞核运输过程中的作用。

以前认为 β 输入蛋白仅在细胞核转运过程中起作用，近来发现 β 输入蛋白对许多的细胞活动都有调节功能。β 输入蛋白可以与运输蛋白和微管相互作用，并且可能利用这些相互作用促进核蛋白沿着微管运动到细胞核外围。β 输入蛋白与其他核转运蛋白因子一起，对有丝分裂过程中纺锤体的装配、有丝分裂之后的细胞核重组及 NPC 的组装都有作用。

5.14 从细胞核中输出蛋白质同样是受体介导的

关键概念

- 富含亮氨酸的氨基酸短链是最普遍的细胞核输出序列。
- 细胞核输出受体在细胞核中与包含细胞核输出序列（NES）的蛋白质结合并且把它们输送到细胞质。

有些蛋白质是在细胞质中合成，被输入细胞核，之后又被输出细胞核。这种穿梭蛋白大多是转录因子，其活性通过它们的定位来控制。一些蛋白质在细胞核和细胞质之间连续循环的过程被称为细胞核-细胞质穿梭（核-质穿梭）。这些蛋白质不仅包含 NLS 使它们定位到细胞核中，而且还包含出核信号。出核信号被称为核输出信号（NES）。核蛋白输出的基本原理与输入相类似。然而，在调控中存在重要的区别，之后我们会讨论（见 5.17 *可调控的细胞核转运*）。

NES 发现于被 HIV 侵染细胞的生长研究过程中。HIV 有一个 RNA 基因组，某些病毒 RNA 在细胞核中合成，然后被运输到细胞质中进行翻译和组装形成新的病毒。一种被称为 Rev 的小 HIV 蛋白可进入侵染细胞的细胞核，在那里它特异性结合病毒 RNA。RNA-Rev 复合体从细胞核移到细胞质，在细胞质中 RNA 被释放，之后 Rev 再次进入细胞核开始另一轮的 RNA 输出。Rev 蛋白包含 NLS 形式的入核信号和独特形式的出核信号（NES），如图 5.30 所示。

NES 的特性通过不支持病毒复制的 Rev 突变来研究。比较突变的 Rev 和野生型的 Rev 显示，包含 4 个隔开的亮氨酸的大约 10 个氨基酸的序列对于正确的输出是必需的，这解释了突变 Rev 的功能缺失。穿梭于细胞核和细胞质之间的许多细胞蛋白质含有相似的富含亮氨酸序列。图 5.31 展示了 NES 的一些例子。这些富含亮氨酸序列形成了“经典的”NES 并且是促进蛋白质输出到细胞核外的充要条件。

NES 也存在于很多不进入细胞核的蛋白质中。其中的一些蛋白质可能包含 NES 来确保他们在细胞核以外。在大多数细胞的细胞分裂过程中，核被膜降解，在有丝分裂结束后，再一次在每套染色体外形成核被膜。这个过程可能导致非核蛋白被圈定在细胞核中。伴随着核被膜的重组，这些蛋白质的 NES 可以促进它们快速地输出。

如果一个包含有 NES 的蛋白质进入细胞核，它会被一个称为输出蛋白的细胞核输出受体识别，输出蛋白是核转运蛋白家族中的一员。在所有的细胞研究记录中，Crm1 是主要的输出蛋白。运输物质-输出蛋白复合体从细胞核运动穿过核孔通道进入细胞质，在那里释放运输物质。输出蛋白又重新返回细胞核准备下一个输出循环，如图 5.30 所

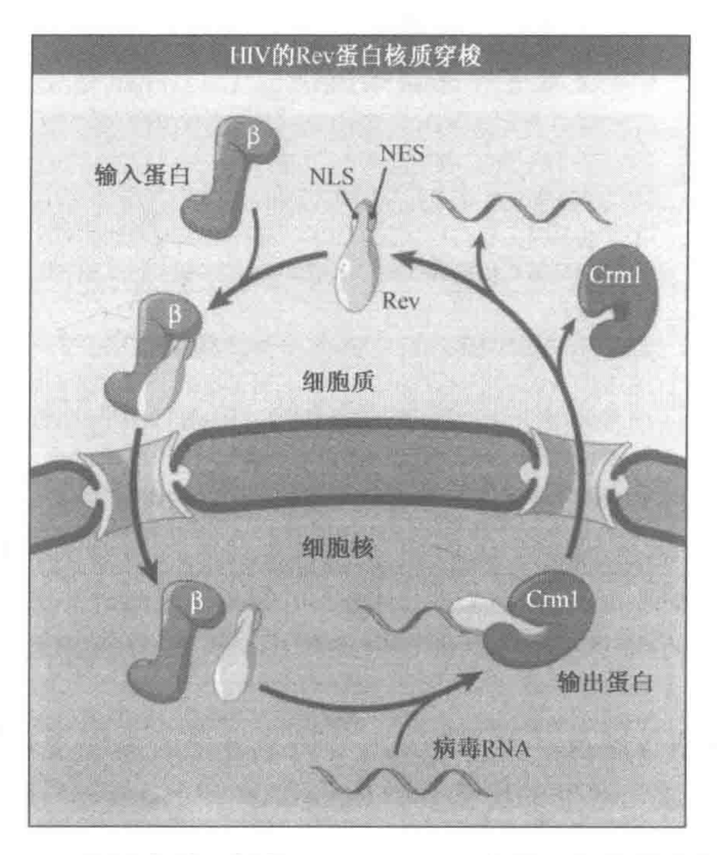


图 5.30　一些蛋白质，例如 HIV 的 Rev，穿梭于细胞核和细胞质间。为了简便，运输过程涉及的其他蛋白没有标出。

示的 Rev 蛋白质。

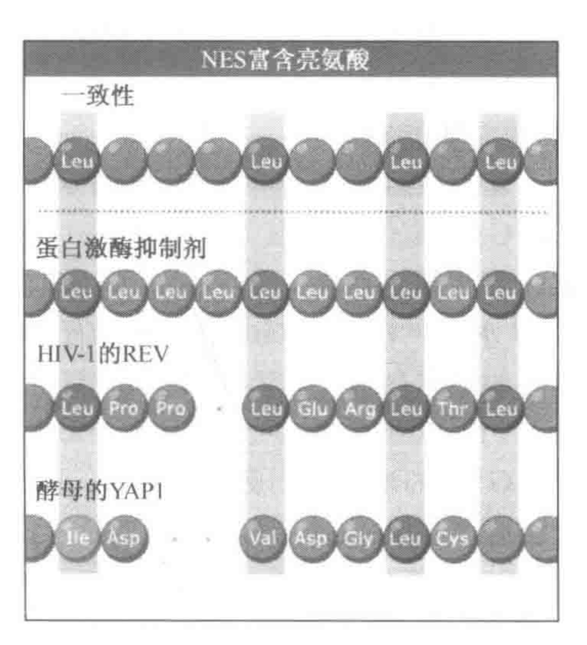


图 5.31　一些特征明显的核输出信号具有高丰度的亮氨酸。其他一些疏水氨基酸，如异亮氨酸和缬氨酸，会在亮氨酸的两侧出现。

柔红霉素是一种从拮抗菌株中提取的天然产物，由于它可以抑制 Rev 的活动，从而抑制 HIV 的生长。柔红霉素阻碍 Rev 细胞核输出是通过其与 Crm1 共价键结合并破坏 Rev 与 NES 的结合能力实现的。因为柔红霉素可阻断所有经典的 NES 依赖的核输出，所以柔红霉素具有细胞毒性而不能作为药品。但柔红霉素对于研究经典 NES 通路是否介导一个给定蛋白质的出核运输是一种有价值的化合物。

除了 Crm1，一些其他的核孔蛋白也可促进输出。以 α 输入蛋白为例，它与运输物质、β 输入蛋白一起进入细胞核，之后必须输出参与另一轮的输入。一种称为 CAS 的输出蛋白结合 α 输入蛋白并携带它返回细胞质。一些 RNA 和运输物质一样通过输出蛋白被输出细胞核（见 5.19 核糖体亚基在核仁中装配，通过输出蛋白 1 输出；5.20tRNA 通过专一的输出蛋白外运；5.24 U snRNA 复合体的输出、修饰、组装复合体和输入；5.25microRNA 的前体从细胞核输出，在细胞质进行加工）。

5.15 Ran GTPase 控制细胞核运输的方向

关键概念

- Ran 是一个小的 GTPase，它普遍存在于所有的真核细胞中，在细胞核和细胞质中都有分布。
- Ran-GAP 通过 Ran 促进 GTP 水解，而 Ran-GEF 促进了 Ran 上的 GDP 交换为 GTP。
- Ran-GAP 存在于细胞质中，而 Ran-GEF 定位在细胞核中。
- Ran 通过结合核孔蛋白控制细胞核转运，并影响它们结合物质的能力。

在任何给定的时间，细胞中有很多蛋白质运入或运出细胞核。运输蛋白的 NLS 或 NES 与核孔蛋白运输家族的一个成员相互作用介导转运过程。转运子穿梭于核内外，在 NPC 的一侧结合物质，在 NPC 的另一侧释放运输物。是什么控制转运的方向？答案是一个被称为 Ran 的小单体 GTP 结合蛋白的作用，它结合在转运子上，并在细胞核和细胞质之间移动。Ran 本身没有 NLS 或 NES。

就像许多 GTP 结合蛋白一样，Ran 本身以非常低的速度水解 GTP 为 GDP。Ran 有自身的调控子来刺激它自身的酶活性。Ran-GAP 和 Ran-GEF 是两个主要的蛋白质，他们调节 Ran 的酶活性。Ran-GAP 是一个 GTPase 激活蛋白，它刺激 Ran 水解结合的 GTP，形成 Ran 的 GDP 结合形式。（见 MBIO：5-0007）。Ran-GEF，它是一个鸟嘌呤核苷交换因子，使 Ran 与新的 GTP 重新结合。Ran-GEF 刺激结合的 GDP 移走，替换为 GTP。因此，Ran 依赖于与它相互作用的调节子，Ran 不但在 GDP 也在 GTP 结合的形式中被发现。Ran-GEF（也称为 Rcc1）和 Ran 都参与有丝分裂纺锤体的组装（见 MBIO：5-0008）。

理解核运输方向的关键是确定 Ran-GAP 和 Ran-GEF 的定位。如图 5.32 所示，Ran-GAP 定位于细胞质中，并且一些 Ran-GAP 与 NPC 的胞质面的纤维丝相结合。这意味着在细胞质中，Ran 以 GDP 结合的形式存在，因为 Ran-GAP 将会刺激结合的 GTP 水解。相反，Ran-GEF 定位于细胞核中。这意味着在细胞核中，Ran 是以 GTP 结合的形式存在，因为随着 Ran-GDP 的核输入，Ran-GEF 可以替换绑定 Ran 的 GDP 为 GTP。Ran 的效应子的这种不对称的分布表明 Ran-GDP 的浓度在细胞质中更高，Ran-GTP 的浓度在细胞核中更高。这种现象已在实验中得到证明，如图 5.33，其中一个结合了 Ran-GTP 而非 Ran-GDP 的蛋白质与两个荧光蛋白融合，黄色荧光蛋白（YFP）和青色荧光蛋白（CFP），并在细胞中表达。当这个与 Ran-GTP 结合的蛋白质不与 Ran-GTP 结合时，融合蛋白的 YFP 和 CFP 结构域非常接近并有能量转移。这种交互作用称为荧光共振能量转移（FRET），可以使用荧光显微镜检测（见 TECH：5-0001）。因此，当融合蛋白存在 Ran-GDP 的形式时，将出现 FRET。相反，当存在 Ran-GTP 形式时，融合蛋白将与之结合。这种结合阻止 YFP 和 CFP 结构域的相互作用并消除 FRET 信号。如图 5.33 显微照片右侧底图表明细胞核中检测到蓝色的 FRET 信号，说明 Ran-GTP 在细胞核中以高浓度存在而在细胞质中却不是如此。图左侧下部显示的人为控制实验中，一个细胞表达 Ran 的突变形式（RanT24N），它结合 Ran-GEF 并阻止它将野生型 Ran 结合的 GDP 替换为 GTP，导致细胞核中一个被降低

的 Ran-GTP 水平。可在细胞核中看见一个更脆弱、绿色的 FRET 信号。这些结果证明，在细胞核中 Ran 主要结合 GTP，而在细胞质中主要结合 GDP。据估计细胞核中 Ran-GTP 的浓度大约是细胞质中的 200 倍。

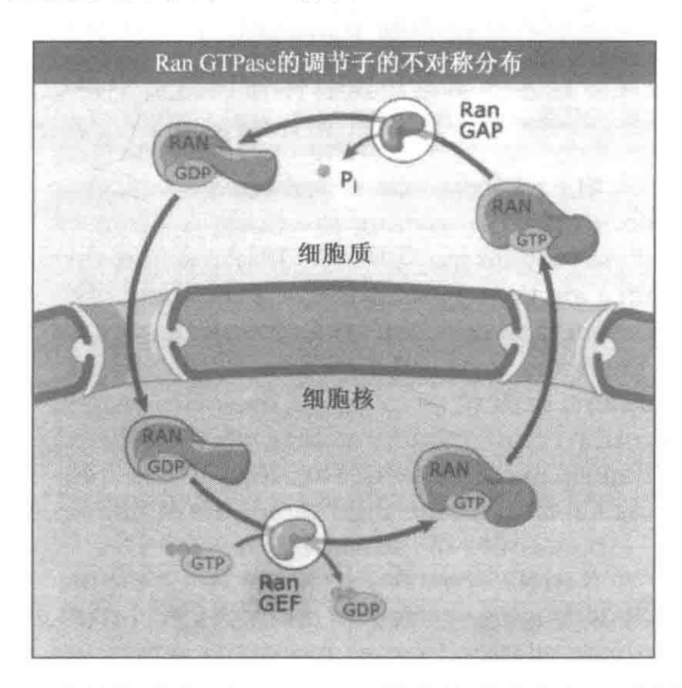


图 5.32 在细胞质中，Ran 以 GDP 结合的形式存在，而在细胞核中以 GTP 结合的形式存在，这是因为酶的分布影响 Ran 结合和水解 GTP 的能力。为了简便，运输过程涉及的其他蛋白没有标出。

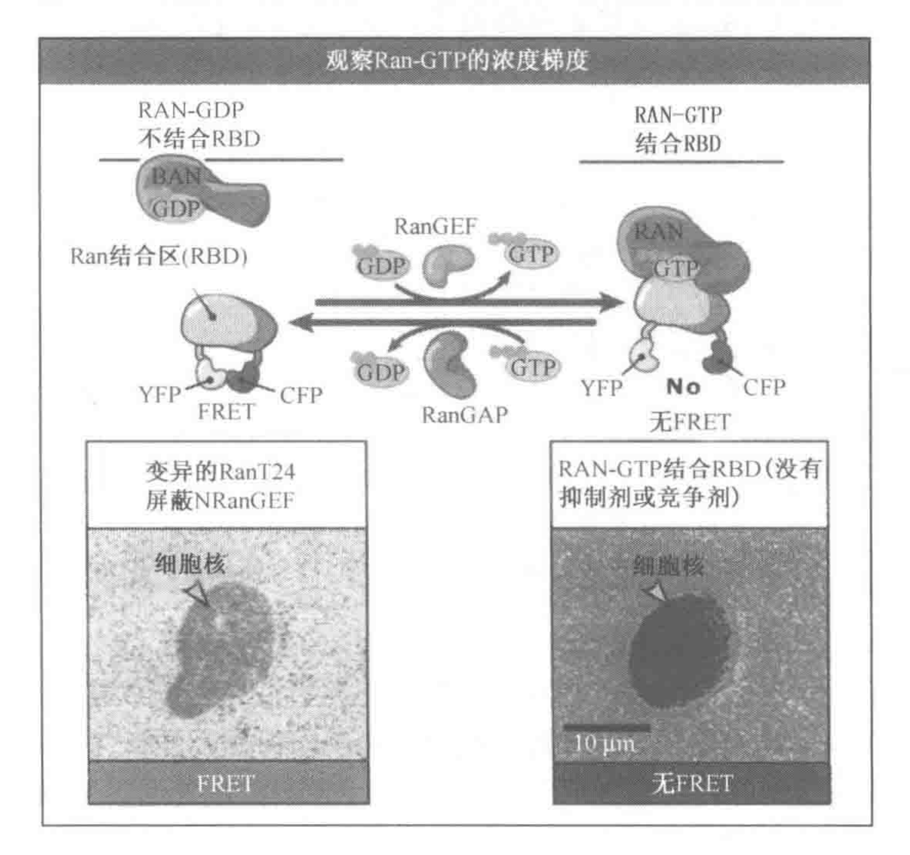


图 5.33 利用一个只能与 Ran-GTP 结合的 Ran 结合区分析不同细胞区域 Ran-GTP 和 Ran-GDP 的相对浓度。图片经许可复制自 Kalab, P., Weis, k., and Heeld, R. 2002. *Science*. 295: 2452-2456. © 2002 AAAS。图片由 California 大学 Berkeley 分校的 Rebecca Heald 惠赠。

Ran 通过与核孔蛋白的结合和影响它结合运输物的能力来控制细胞核转运的方向。依据其结合输入子或输出子，Ran 的转运效果是不同的。以细胞核中的输入受体——输入蛋白为例。在细胞质中，输入蛋白结合包含 NLS 的运输蛋白，如图 5.34 所示。一旦进入细胞核，输入运输蛋白复合体结合到 Ran-GTP 上。这引起蛋白复合体的重排，导致运输物质的解聚。因此，输入运输蛋白复合体在细胞质中是稳定的，但是在细胞核中结合 Ran-GTP 之后就解聚分离。注意，虽然在细胞质中 Ran-GDP 的浓度是很高的，但输入蛋白结合运输物或输入过程都不需要 Ran-GDP。

相反，输出蛋白结合带有 NES 的运输物质蛋白需要 Ran-GTP。在细胞核中 Ran-GEF 的存在维持 Ran-GTP 的高水平。Ran-GTP、输出蛋白和运输物共同结合在一起，形成一个三聚体复合物，如图 5.34。在复合物通过核孔进入细胞质后，这个复合物遇到 Ran-GAP，它水解 GTP。这引发三聚体的解聚，从而释放输出运输蛋白。

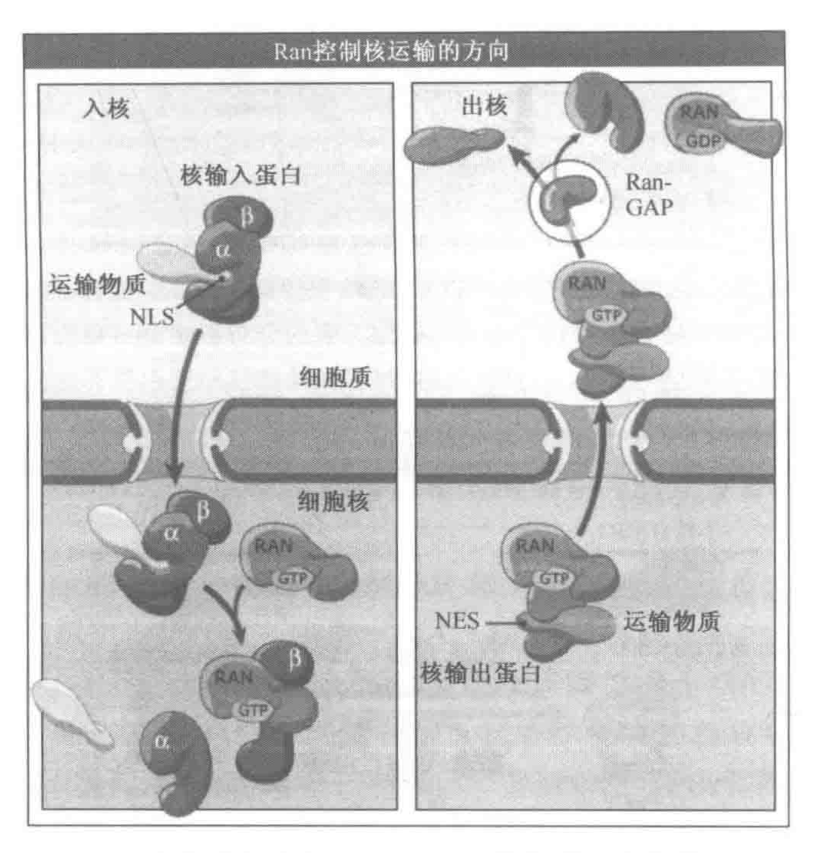


图 5.34　输入蛋白在细胞质结合运输物质，在细胞核内与 Ran-GTP 结合后释放运输物质。相反，出核复合体与 Ran-GTP 在细胞核内形成。在细胞质中随着 GTP 的水解，输出核外的运输物质被释放。

GTP 和 GDP 结合形式的 Ran 在细胞核和细胞质中的适当分布对于核运输的发生是至关重要的。在大多数细胞中，Ran 积聚在细胞核中。但是，在任何给定的时间，都有一些 Ran-GTP 与输出蛋白一起移出细胞核。在 GTP 水解之后，运输物释放，Ran-GDP 通过它自身的运输受体，Ntf2，被输入返回细胞核，如图 5.35。一旦进入细胞核，Ran-GEF 以 GTP 替换掉 Ran 结合的 GDP，导致 Ntf2 从 Ran 中解离。Ntf2 之后出核参与另一轮的 Ran-GDP 输入。

除了 Ran-GAP 和 Ran-GEP，有很多其他蛋白结合 Ran 影响它的活性。一个 Ran

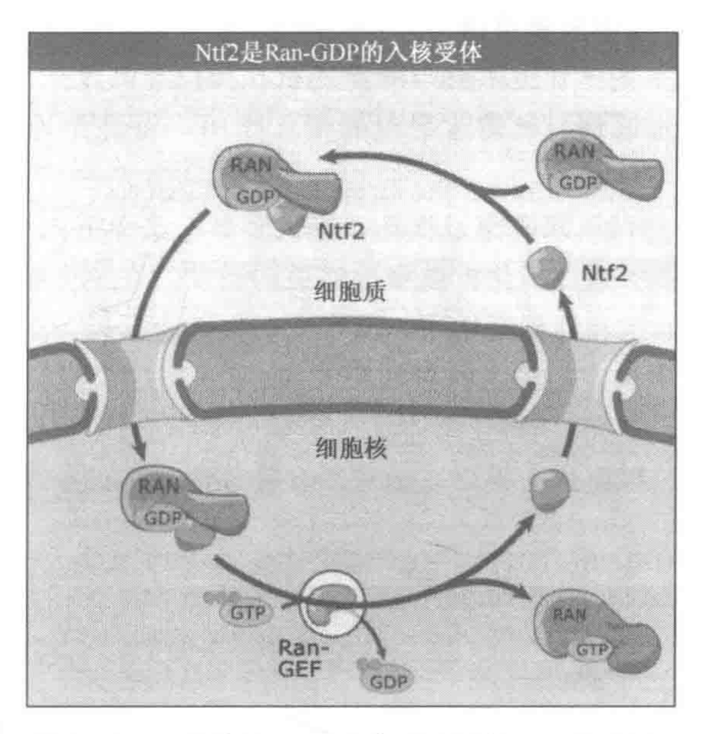


图 5.35　一种称为 Ntf2 的小蛋白调节 Ran 的入核。

结合蛋白（RanBP1）位于 NPC 的胞质表面，在那里 RanBP1 刺激 Ran GTPase 的活性，通过 Ran-GAP 提高运输物释放的效率。第二个 Ran 结合蛋白（RanBP3）位于细胞核内，它对于促进输出蛋白和 NPC 的相互作用非常重要。为了确保 NPC 中 Ran 的高浓度，在细胞核面和细胞质面，一些核孔蛋白也与 Ran 结合。如 Nup358，也被称为 RanBP2。

在有丝分裂过程中 Ran 也起重要作用，并且通过与 β 输入蛋白的相互作用，Ran 调控关键蛋白传送到有丝分裂纺锤体。

5.16　基于细胞核转运机制的多个模型

关键概念

- 核转运蛋白和核孔蛋白的相互作用对于通过核孔的迁移是至关重要的。
- 核运输的方向性部分决定于核转运蛋白与某些核孔蛋白的特异作用。

我们现在知道，运输物结合核转运受体，受体停泊在核孔复合体上，是蛋白质细胞核靶向定位的重要事件。但是，通过什么机制使运输物蛋白-核转运受体复合物穿过核孔通道目前还不清楚。横向穿过的距离可以达到 200nm，但还是不清楚是否需要一种与驱动蛋白和肌球蛋白相关的分子马达或者 ATP 水解。

早期实验表明，通过 NPC 的转运需要 ATP 的水解。但是，之后的实验表明，为了维持足够的 GTP 水平以支持转运，ATP 是必需的。在核转运过程中，仅知道 GTP 的水解对 Ran 控制转运方向具有一定作用。

核转运蛋白-运输物质复合物如何穿过核孔通道还不清楚。考虑可能的迁移机制，我们需要关注我们知道的因素：

- 核转运蛋白与大多数核孔蛋白通过苯基丙氨酸-氨基乙酸（FG）重复相互作用，

这些 FG 重复排列在核孔中央通道内。

• 结合研究表明一些核转运蛋白与特定的核孔蛋白有高度亲和性。

• Ran 不仅介导运输物与核转运蛋白的相互作用，而且介导核转运蛋白和核孔蛋白的相互作用。

• 虽然核转运蛋白可以双向穿过核孔，但大多数只是单方向携带运输物。

一个简单的模型显示通过易化扩散穿过通道的运动。在这个模型中，转运受体可以与核孔蛋白有短暂的低亲和性相互作用，没有方向性结合反应。运动的方向由核孔任一侧 Ran 依赖的终止步骤决定，输入过程如图 5.36 所示。这个模型的一个更复杂的解释是，转运的方向是由于随着运输物/受体复合物穿过 NPC 通道，转运受体和核孔蛋白之间亲和力梯度的增加。根据这个模型，随着复合体逐渐增加的亲和力梯度，复合体将遇到核孔蛋白。

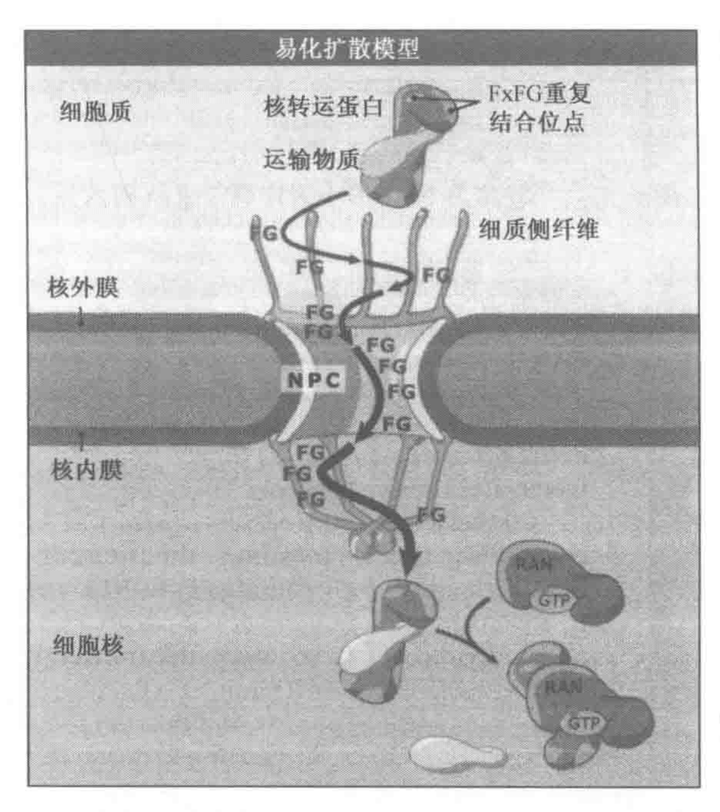


图 5.36 转运蛋白与大多数核孔蛋白通过苯基丙氨酸-氨基乙酸（FG）重复相互作用，这是理解物质如何通过核孔运输的关键。

另一个模型是观察排列于核孔通道内的许多包含 FG 的疏水核孔蛋白。这些核孔蛋白的 FG 结构域被认为是没有组织的，在核孔通道中要求创造疏水的环境。在选择阶段模型中，如图 5.37，核孔蛋白的富含 FG 区之间的相互吸引力构成了核孔蛋白质的中央屏障，这个屏障使大多数蛋白质不能通过。这个模型进一步提出在 NPC 通道这个特殊的环境中，核转运蛋白具有选择性的亲和力。这将核孔排除许多蛋白质通过核孔的能力与核转运蛋白复合体的易化扩散相联系。但是，核转运蛋白与 FG 核孔蛋白相互作用的能力将允许它们选择性分开进入和通过这个特殊的核孔区域，并且转运它们结合的运输物质。这个模型的证据依然处于初级阶段，但是入核的快速动力学支持这个模型，而且观察到核转运蛋白与核孔蛋白的 FG 重复相互作用。然而，这个模型没有解释大的复合

物，如核糖体和 mRNA 蛋白复合物如何转运。

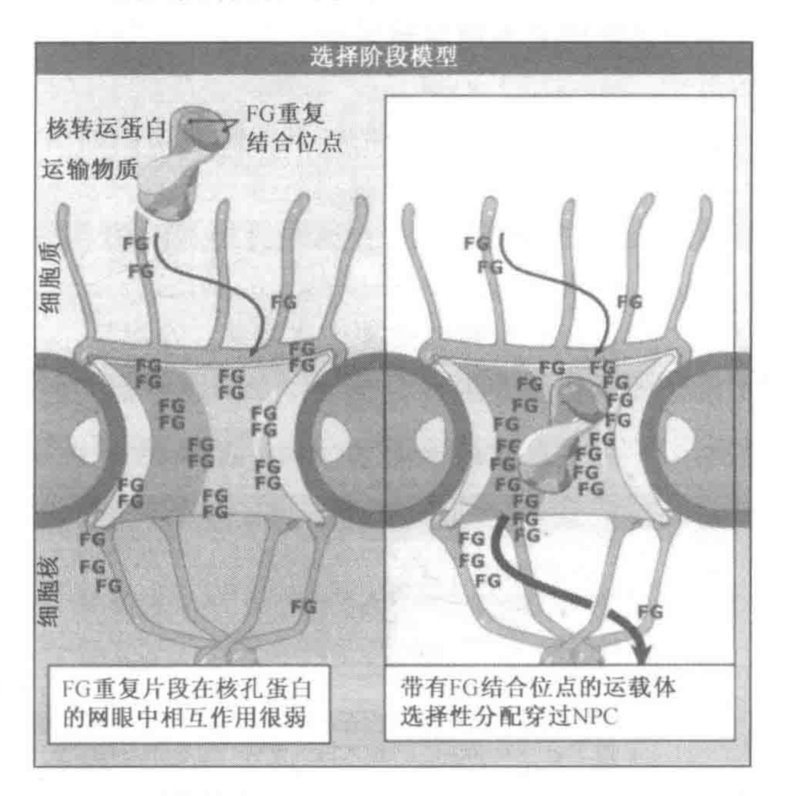


图 5.37 选择阶段模型认为 FG 重复序列阻止大多数蛋白质在 NPC 中迁移。包含 FG 重复结合位点的蛋白质可以干扰内部的相互作用并穿过 NPC。

借助荧光显微镜的新生物物理方法开始探测单个分子，并且这些方法正在被应用到细胞核转运的研究中。这些研究表明，通过 NPC 通道的运动非常快（平均 10 ms），大多数核孔蛋白运输物复合体的运动在 NPC 通道是随机的，并且速率限制步骤可能脱离中央通道进入细胞核。这些研究还说明一个 NPC 可以同时运输至少十个底物分子（和它们的受体），并且一个 NPC 每秒可以转运约 1000 个分子。

5.17 可调控的细胞核运输

关键概念

- 蛋白质的输入和输出都是可调控的。
- 细胞利用核运输来调节许多功能，包括通过细胞周期及对外部刺激的应答。
- 转录因子 NF-κB 的运动阐明了细胞核运输是如何被调控的。

在真核生物中核被膜的存在在一定水平上使基因表达和细胞周期得以调控，这在原核生物中是不可能的。蛋白质输入和输出都是可调控的。对于核运输调控的重要性有许多例子。细胞通过对转录因子在细胞核和细胞质之间运动的调控来控制转录，从而实现对应激和生长控制信号的应答。例如，通过调控周期性和非周期性（永恒）转录因子的核转运来控制生理节律。此外，在细胞核和细胞质之间蛋白激酶及其调节子的运动对于推动细胞周期的行进和外界刺激的应答是非常重要的。

可以在多个水平上调控蛋白质的入核和出核。第一，运输物质与转运受体之间的相

互作用的能力可通过对运输物质的直接修饰，如磷酸化。第二，运输物质可以锚定在细胞的一个区域，因此锚定解除前它不能与转运子一起移动。第三，NPC 本身转运蛋白质的能力是被调控的对象。

转录因子 NF-κB 的运动表明了调控运输的许多关键方面，如图 5.38 所示。为了应答许多刺激，NF-κB 从细胞质移入细胞核并激活许多与免疫反应有关的重要基因的转录。为了确保 NF-κB 只被适当的刺激激活，在细胞质中 NF-κB 与一种抑制蛋白，称为 I-κB（κB 的抑制子）结合。这种结合阻止了 NF-κB 的 NLS 与 α 输入蛋白的相互作用。当细胞接受刺激激活 NF-κB，I-κB 被磷酸化并快速降解。这揭示了 NF-κB 的 NLS 允许 NF-κB 与其输入蛋白受体相互作用并进入细胞核，在细胞核中 NF-κB 激活其靶基因的转录。

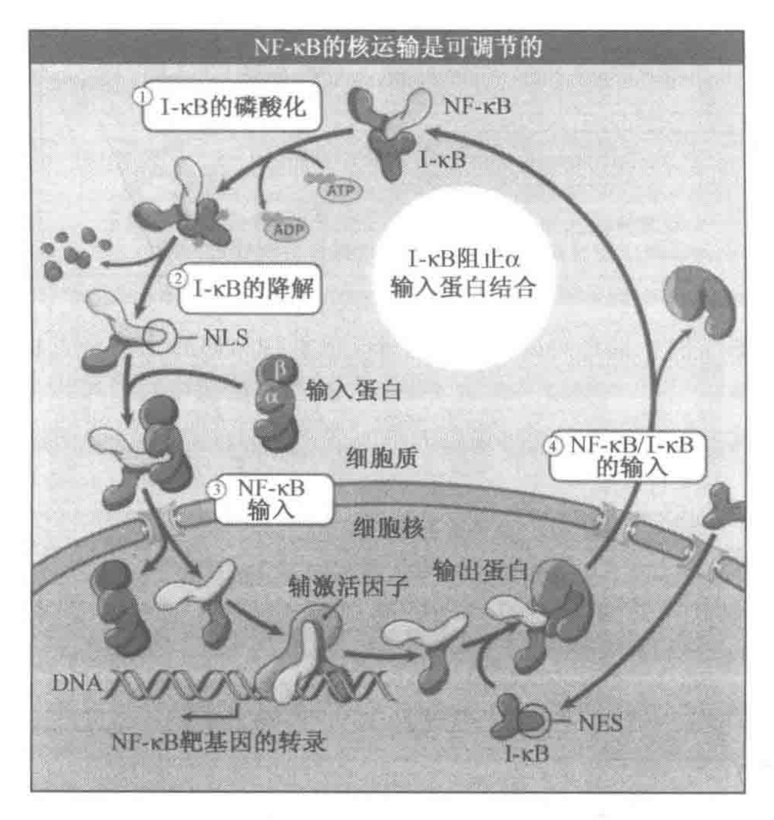


图 5.38　NF-κB 移入和移出细胞核是高度调节的过程，它们分别依赖于共价修饰的细胞质锚定蛋白 I-κB 和新合成的 I-κB。为了简便，Ran 没有标出。

相反的，NF-κB 在一个适当的时间输出从而终止转录反应。I-κB 包含 NLS 和 NES 元件并穿梭于细胞核和细胞质之间。新合成的 I-κB 进入细胞核，在细胞核内结合 NF-κB 从而促进 NF-κB 的核输出。此外屏蔽 NF-κB 的 NLS，NF-κB 与 I-κB 之间的相互作用还可以屏蔽 I-κB 的 NLS。因为 NF-κB 和 I-κB 的复合体中两种蛋白质的 NLS 是屏蔽的，所以 NF-κB 和 I-κB 的复合体留在细胞质中，阻止 NF-κB 依赖的转录活化。因此，细胞通过调控转录因子的入核和出核，控制它们对不同刺激的应答。应答是迅速的，因为 I-κB 的磷酸化和 NF-κB 的转运在细胞受刺激后的几分钟内完成。相反，如果需要新的转录和翻译，产生一个激活的转录因子需要 30～60min。

5.18 多种 RNA 从细胞核输出

关键概念

- mRNA、tRNA 和核糖体亚基在细胞核中生产，通过 NPC 转运到细胞质中，在翻译时行使功能。
- 用于蛋白质转运的 NPC 也同样用于 RNA 输出。
- RNA 输出是受体介导和能量依赖的。
- 每种 RNA 的转运需要不同的可溶性转录因子。

在真核细胞中，几乎所有的 RNA 都是在细胞核中生产，在细胞质中翻译（见 MBIO：5-0009）的。因此，mRNA、tRNA 和包含 rRNA 的核糖体亚基必须从细胞核中输出，如图 5.39。大多数 RNA 不包含输出信号，但是为了输出细胞核必须结合在包含 NES 的蛋白质上。事实上，细胞中的 RNA 分子总是与蛋白质形成复合体，以保护 RNA 不被降解，并介导 RNA 分子与其他细胞组分的相互作用。

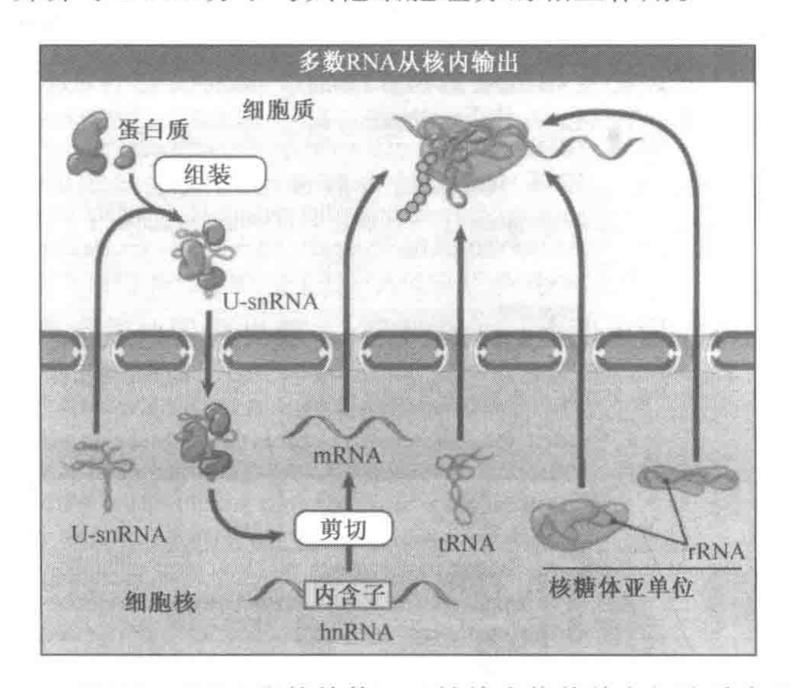


图 5.39 mRNA、tRNA 和核糖体亚基被输出核外并在细胞质中的蛋白质合成中行使功能。U-snRNA 被输出、加工，组装成 RNA-蛋白质复合体，再被运回细胞核参与 RNA 的加工。

用于蛋白质转运的 NPC 也同样用于 RNA 核输出。通过电子显微镜可观察这一现象。将包被有 RNA 的胶体金粒注入到爪蟾卵母细胞核中。通过电镜检测卵母细胞的切片，在 NPC 通道中可看到金粒。当细胞核中注入饱和量的金粒时，大多数 NPC 包含一个或更多包被有 RNA 的金粒。在另一个实验中，如果细胞质中注入足够的包被 NLS 的金粒，可以看到大多数的核孔都包含金粒。这些结果说明 RNA 的输出和蛋白质的输入使用相同的 NPC。实验表明当一种大小的包被蛋白质的金粒和另一种大小的包被 RNA 的金粒分别被注入到细胞质和细胞核中，许多核孔包含两种大小不同的金粒，如图 5.40 所示。

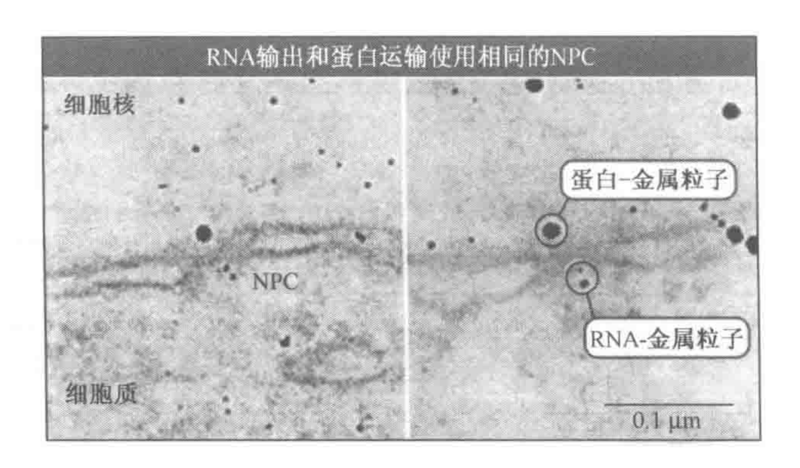


图 5.40　用含有 NLS 的核质蛋白包裹大的金属粒子，将其注入爪蟾的卵母细胞质中，将包被有 RNA 的小金属粒子注入核中。图中显示核孔中存在蛋白质-金属粒子从 NPC 的细胞质侧移向细胞核侧，而 RNA-金属粒子是从相同 NPC 的细胞核侧移向细胞质侧。图片复制自 *The Journal of Cell Biology*，1988，vol. 106，pp，575-584，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。图片由 Carl Feldherr 和 Steve Dworetzky 惠赠。

几乎所有类型的 RNA 都从细胞核输出。通过下面的研究可证明这一现象，将放射性标记的 RNA 注入到爪蟾卵母细胞核中。孵育之后使转运发生，分离细胞组分，分析观察细胞核和细胞质两部分，确定 RNA 是否被输出到细胞质中。这些研究阐明 mRNA、tRNA、rRNA 和 U-snRNA 被输出，如图 5.41 所示。相反，如果 RNA 被注入细胞质中，它们停留在细胞质中。这说明 RNA 运输是没有方向的。如果在 0℃ 进行细胞核注入实验，没有 RNA 输出发生。这说明 RNA 输出和蛋白质运输一样，是能量依赖的过程。

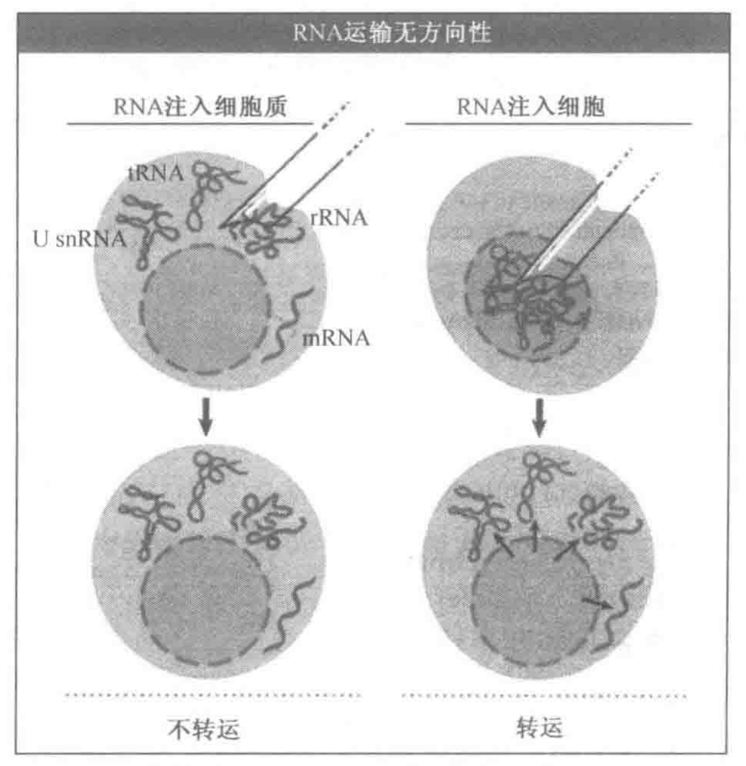


图 5.41　大多数 RNA 从细胞核移入细胞质是没有方向性的。

不同类型的 RNA 的输出是通过相同的转运受体介导的吗？通过确定是否一种类型的 RNA 与另一种类型的 RNA 存在输出竞争来分析这一问题。在这些实验中，将放射性标记的一类 RNA 和同类或不同类的未标记的 RNA 一同注入到细胞核中。孵育之后，分离细胞核和细胞质，通过电泳分析确定是否注入的 RNA 被运输。

如图 5.42，放射性标记的 tRNA 被注入到卵母细胞核中，检测未标记的 tRNA 或 U1snRNA 的增量效应。未标记的 tRNA 与标记的 tRNA 竞争输出，但是未标记的 U1RNA（或其他类型的 RNA）则不与标记的 tRNA 竞争输出。未标记的 tRNA 与标记的 tRNA 竞争输出的事实表明，tRNA 输出类似于蛋白质输入，是一个可饱和的过程。这意味着在输出过程中与 tRNA 相互作用的一些蛋白质或其他的细胞组分的数量是有限的。发现其他 RNA 不与标记的 tRNA 竞争输出的结果说明，tRNA 输出不需要限制它们的输出速率的因子参与。共同注入标记的任何其他类别的 RNA 和未标记的不同类别的 RNA，得到的是相同的结果。

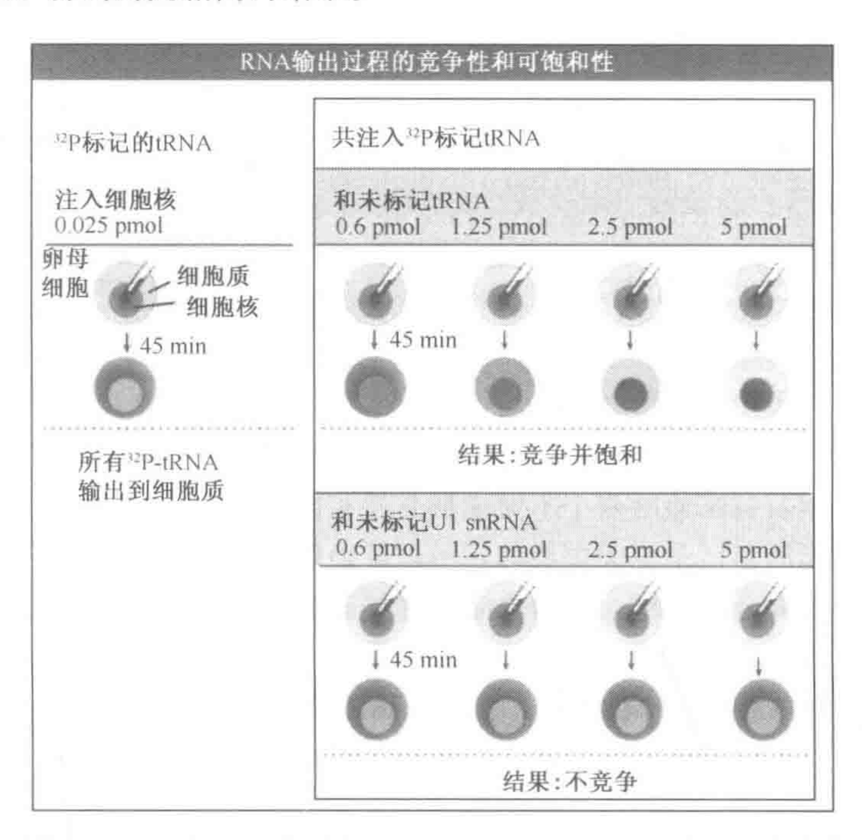


图 5.42 RNA 输出是可饱和的。不同类型 RNA 的输出由不同的转运蛋白介导，转运蛋白的丰度限制输出速率。

从这些研究中得到的基本结论是，每一类型 RNA 的输出至少需要一类特殊类型的限速因子。我们知道所有输出的 RNA 都利用相同的 NPC，所以 NPC 的数量是不限制的。这些研究没有说明每类 RNA 转运中涉及多少因子，输出单一种类的 RNA 有多少因子是共享的和有多少因子是唯一需要的（不同 RNA 输出的细节见 5.19 核糖体亚基在核仁中装配，通过输出蛋白 1 输出；5.20 tRNA 通过专一的输出蛋白外运；5.21 信使 RNA 及 RNA-蛋白质复合体的形式输出细胞核；5.23 mRNA 的输出需要几种新因子；5.24 U snRNA 复合体的输出、修饰、组装复合体和输入；5.25 microRNA 的前体从细胞核输出，在细胞质进行加工）。

5.19 核糖体亚基在核仁中装配，通过输出蛋白1输出

关键概念

- 核糖体亚基在核仁中组装，rRNA 在核仁中产生。
- 核糖体蛋白从细胞质被输入细胞核，并组装成核糖体亚基。
- 核糖体亚基的输出是载体介导的，需要 Ran 参与。

核糖体包括两个亚基，它是由大约 80 个蛋白质和 4 个核糖体 RNA（rRNA）组成的大型复合体。亚基分别在核仁中组装并被输出到细胞质进行最后的组装。核糖体亚基是可以通过 NPC 运输的最大的复合体成员，核糖体亚基是核孔通道可以通过的上限。由于这些亚基的尺寸很大，当一个核糖体亚基通过 NPC 通道时其他的大分子就不能被运输。核糖体运输与之前提到的 RNA 和蛋白质在相同的 NPC 中的运输相矛盾（见5.18 多种 RNA 从细胞核输出）。

两个核糖体亚基的组装和输出是非常复杂的过程，并且高度依赖细胞核运输。核糖体的生物合成过程涉及细胞核运输的 50%。细胞中核糖体组分是含量最丰富的蛋白质和 RNA。核糖体蛋白在细胞质中合成，之后被输入细胞核，并进入核仁。在那里，核糖体蛋白与 rRNA 前体相互作用，在核仁中被转录并组装成因子。随着正确的组装，每一个亚基通过 NPC 被输出。在细胞质中，亚基与转录起始因子、mRNA 组装形成成熟的翻译核糖体。

迄今为止已经被研究的所有的核糖体蛋白的细胞核输入都使用核转运蛋白家族成员和 Ran GTPase。但是，至少还有一些核糖体蛋白利用不只一个专一的输入因子。例如在酵母中，核转运蛋白家族的两个不同成员介导相同核糖体蛋白的输入。因为正确的核糖体产生对于细胞的存活是至关重要的，所以要确保有充分的组分用于组装。

与其他输出的大分子一样，核糖体亚基的输出是可饱和的，表明它是受体介导的。这可利用显微注射核糖体亚基进入爪蟾卵母细胞核来验证。此外，核糖体亚基不与其他的 RNA 蛋白复合体相互竞争输出，表明核糖体亚基使用不同的转运受体。甚至细菌核糖体也可被输出，表明真核生物的输出组件可以识别这些核糖体。这些组件可能是一致的，但它也可能说明输出组件在真核细胞进化早期已有发展，以适应祖传的原核生物核糖体。

核糖体亚基的输出受体是什么？基于酵母突变的研究，我们知道大亚基（60S）和小亚基（40S）的输出都需要输出蛋白 Crm1（还有 Ran）。一个称为 Nmd3 的接头蛋白与 60S 亚基结合从而促进 Crm1 的结合，如图 5.43 所示。40S 亚基的输出也依赖于输出蛋白，但是它却不需要 Nmd3，而且也没有发现其他的接头分子。酵母中的其他研究表明，核糖体亚基的输出需要另一种蛋白 Rrp12。这种蛋白质与核转运蛋白质家族受体具有结构相似性，并且与核转运蛋白一样，既可与核孔蛋白的 FG 重复单位结合又可与 Ran 结合。Rrp12 还可结合到前体 rRNA 上。

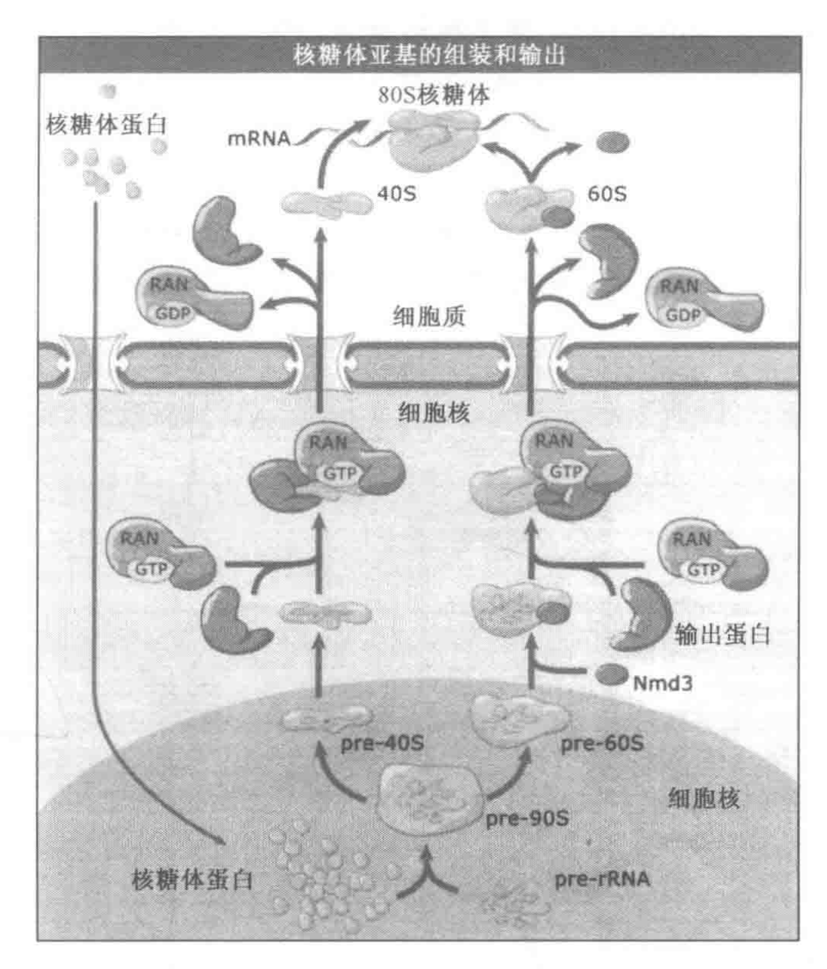


图 5.43 利用 rRNA 和输入的核糖体蛋白在核仁内组装核糖体亚基。这些亚基以 Ran 依赖的方式通过 Crm1 输出。Nmd3 促进 Crm1 结合到大亚基上。

5.20 tRNA 通过专一的输出蛋白外运

关键概念

- 输出蛋白 t 是 tRNA 的转运受体。
- tRNA 输出需要 Ran。
- tRNA 输出可能受 tRNA 修饰的影响。
- tRNA 可能被再次输入细胞核。

tRNA 在细胞核中转录，它们在细胞核中加工，然后被运到细胞质，在细胞质中它们被氨基化并参与翻译。只有完全加工好的 tRNA 才被输出（见MBIO：5-0010）。

细胞核 tRNA 的输出是由专一的转运受体介导的，并且需要 Ran。tRNA 的输出是受体介导的实验显示，逐渐增加的 tRNA 注射到爪蟾的卵母细胞核中会导致输出达到饱和。Ran 的不对称分布（Ran-GTP 在细胞核内，Ran-GDP 在细胞质内）对于 tRNA 的外运也是至关重要的。将正常细胞质中的 Ran-GAP 注射到细胞核中发现 tRNA 的输出需要 Ran。因为 Ran-GAP 通过 Ran 刺激 GTP 水解，阻止 Ran-GTP 积累在细胞核中，从而抑制 tRNA 的输出。

tRNA 外运载体是输出蛋白 t，属于核转运蛋白家族中的一员。输出蛋白 t 是唯一能直接结合 RNA 的核转运蛋白。此外，它优先与完全加工的 tRNA 结合，因此确保未加工的 tRNA 在成熟前不被输出。如图 5.44 所示，在细胞核内输出蛋白 t 在 Ran-GTP 存在的情况下直接结合 tRNA，从而形成 tRNA 输出蛋白- Ran-GTP 三聚体复合物。这个复合物类似于其他输出蛋白与包含 NES 的蛋白质形成的复合物。这个三聚体复合物穿过核孔进入细胞质。Ran-GAP 通过 Ran 刺激 GTP 水解后，复合物解聚，释放 tRNA。

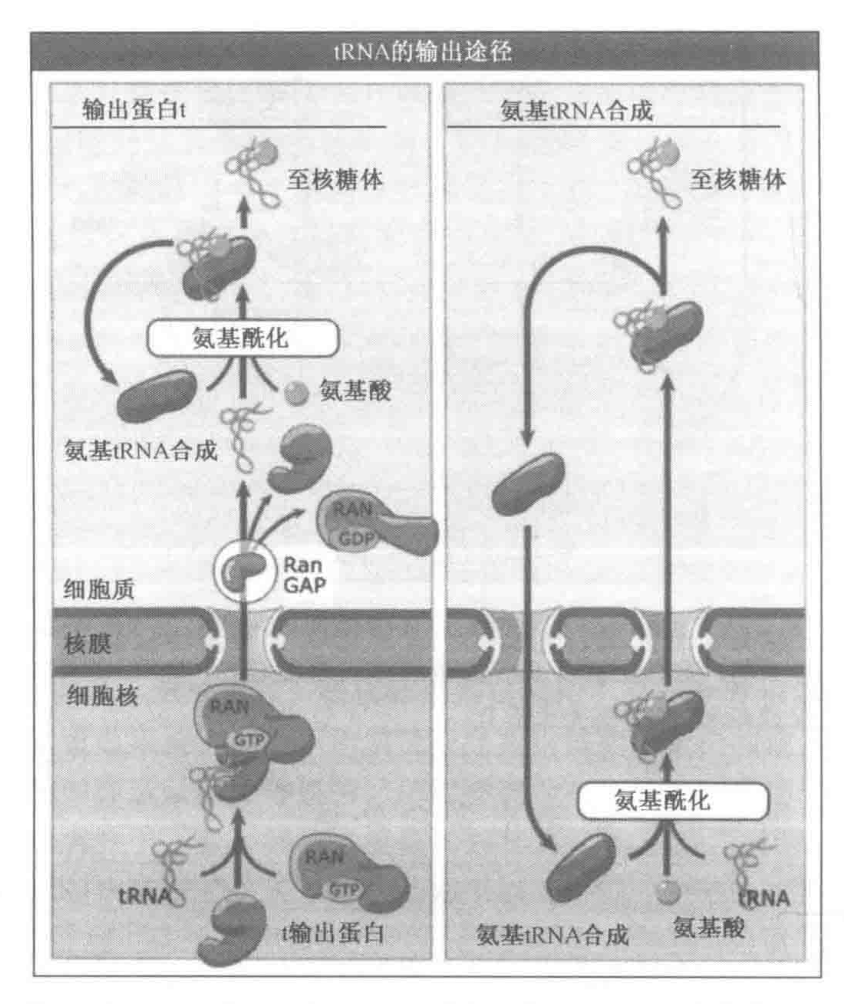


图 5.44　（左图）tRNA 与输出蛋白 t 结合利用 Ran 介导的途径输出细胞核。（右图）氨基化在 tRNA 的输出中起重要作用。

tRNA 通过氨基化在翻译中发挥作用，这个过程通常发生在细胞质中。然而，tRNA 的氨基化也可能发生在细胞核中。一些研究表明氨基化的 tRNA 能更有效地输出，并且是输出蛋白 t 优先选择的底物。因为氨基化取决于 tRNA 前体的提前完成和精确加工，所以氨基化可能是一种更进一步的校对机制以保证在细胞质中唯一功能性的 tRNA 出现，用于翻译。

一些 tRNA 通过剪接成熟，剪接机制是剪接前体 mRNA。在酵母中，一些 tRNA 剪接酶定位在细胞质，tRNA 剪接缺失的突变体会在细胞质中积累未被剪接的 tRNA。在细胞核中发现了这些 tRNA 的成熟形式，这表明剪接后的 tRNA 被输入细胞核，然后又被输出。这个过程可能需要更复杂的校对从而确保只有正确加工的 tRNA 才能参与

蛋白质的合成。

酵母中的 Los1 基因编码输出蛋白 t。有趣的是，Los1 对于酵母细胞的存活是非必需的，这就表明对于 tRNA 存在其他的输出途径。tRNA 足够小（～30 000Da），它们可能通过简单扩散输出细胞核外。如果这样，会导致 tRNA 在整个细胞中的浓度均一。然而，我们知道大多数 tRNA 是细胞质的。所以是否存在其他介导 tRNA 外运的受体？如果一个酵母细胞具有突变从而减慢 tRNA 合成，那么它就不能存活，除非有完整的输出蛋白 t。这个观察表明，将氨基酸加到 tRNA 上的酶——氨基化 tRNA 合成酶——可能作为 tRNA 外运受体而发挥作用，如图 5.44 所示。这个模型中需要这些 tRNA 合成酶的穿梭。它们能在细胞核内结合并氨基化 tRNA，然后运输氨基化的 tRNA 到细胞质，释放 tRNA 用于翻译，然后重新进入细胞核。

5.21 信使 RNA 以 RNA-蛋白质复合体的形式输出细胞核

关键概念

- 转录过程中与 mRNA 结合的蛋白质帮助前体 mRNA 确定加工的位点，同时包装 mRNA 进行细胞核输出。
- 在细胞核中与 mRNA 结合的蛋白质在核输出后，与 mRNA 解离并返回细胞核。一小部分蛋白质在核输出之前即迅速地与 mRNA 分离。
- mRNA 输出信号可能存在于 mRNA 结合的蛋白质中。
- mRNA 的输出是可调控的，但调控机制尚不清楚。

正如我们先前讨论的，大多数 RNA 在细胞核中产生，输出到细胞质中发挥作用（见 5.18 细胞核输出 RNA 的多样模型）。从转录到输出，mRNA 的生物合成的所有事件都是相互联系的。RNA 和蛋白质形成复合体被输出，而裸露的 RNA 不能被输出。以 mRNA 为例，随着 mRNA 的合成，多种蛋白质与 mRNA 前体结合，如图 5.45 所示（见MBIO：5-0011）。形成的 RNA-蛋白质复合体称为不均一性核糖核蛋白颗粒（hnRNP），这些蛋白质（除 5′端帽子结合蛋白和 Poly-A 尾结合蛋白外）称为 hnRNP 蛋白。

人类细胞中至少存在 20 种不同的 hnRNP 蛋白。一些蛋白质能帮助组织前体 mRNA 从而进行正确的加工。这一过程是很重要的，因为只有完全地正确加工的 mRNA 才能被外运（见 5.23 mRNA 的输出需要几种新因子）。细胞可以监测错误加工的 mRNA，避免外运有缺陷的 mRNA，从而减少对细胞有害的缺陷蛋白质的直接形成。

在细胞核中与 mRNA 结合的许多蛋白质的功能是帮助其包装输出。大多数真核细胞包含 3000～15 000 种不同的 mRNA。这些 mRNA 的大小、序列及它们折叠形成的二级结构有很大的不同。这些不同的 mRNA 在核输出前形成 RNA-蛋白质复合体从而具有共同的结构特征，这对于 mRNA 的高效核输出是很重要的。某些结合的蛋白质可能包含特异的输出信号。

这些蛋白质和 mRNA 的结合是暂时的。一些蛋白质在 hnRNP 穿过 NPC 之前解离。其他的蛋白质伴随 RNA 输出细胞核。迁移穿过 NPC 后，大部分残留蛋白质被解离，返回到细胞核中参与其他 mRNA 的核输出。

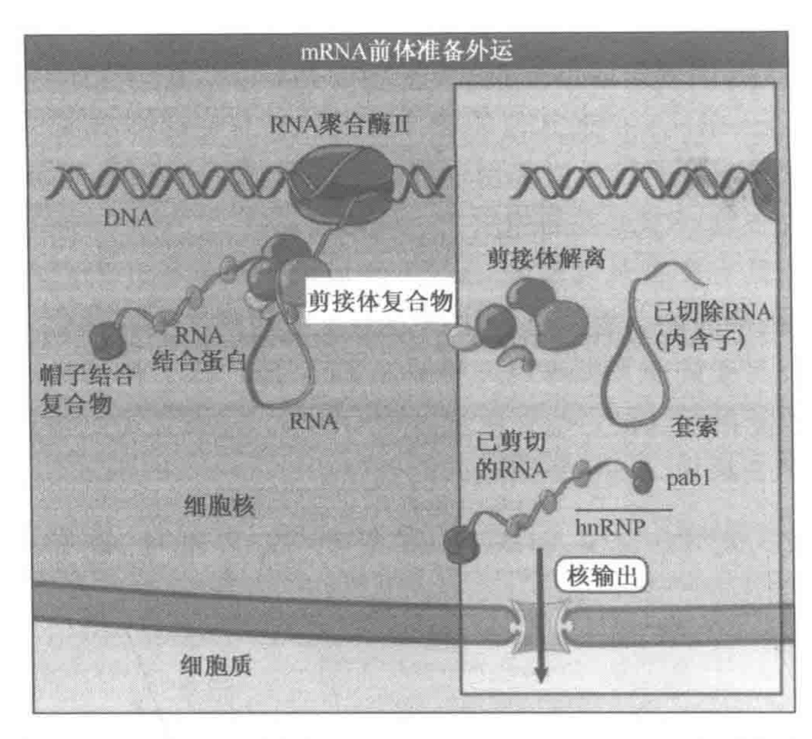


图 5.45 hnRNP 蛋白与正在合成的 mRNA 结合。内含子剪接后，剪接体和套索结构留在核内而与 hnRNP 蛋白结合的 mRNA 外运到细胞质。

因为 hnRNP 是大的复合体，它们可能要改变空间结构从而能穿过 NPC。昆虫摇蚊幼虫（*Chironomus tentans*）具有独特的特征，因此可以观察到 hnRNP 核输出的各阶段。一系列极大的 mRNA 产生在摇蚊幼虫发育的某个特定阶段，由发育信号强诱导的几个基因转录。这些高活性的转录位点被称为巴尔比亚尼环（Balbiani ring）（见 6.14 多线染色体在基因表达的位点形成膨大区域）。产生的 mRNA 很庞大并且和其他 mRNA 一样与 hnRNP 蛋白结合，这些 hnRNP 称为巴尔比亚尼环颗粒。如图 5.46 电子显

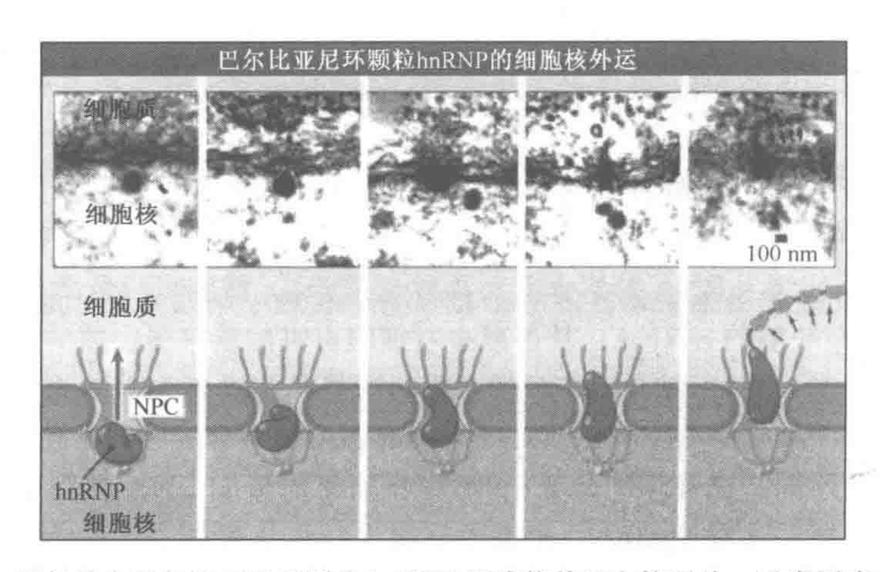


图 5.46 摇蚊幼虫巴尔比亚尼环颗粒 hnRNP 细胞核外运电镜照片。示意图表示电镜下观察的核输出各阶段。图片复制自 *Cell*，vol. 69，Mehlin，et al.，Translocation of a Specific…，pp. 605-613。Copyright 1992，获得 Elsevier 许可。图片由 Nobel 医学研究所的 B. Daneholt 惠赠。

微镜照片所示，它们在细胞核中以小环的形式出现。

巴尔比亚尼环颗粒的直径大约为27nm，比NPC通道的直径大许多。通过电镜样品的固定处理，我们能够看到转运不同时期的巴尔比亚尼环颗粒。如图5.46所示，巴尔比亚尼环颗粒在通过NPC时变成线形。线形hnRNP跨越NPC并且两端分别延伸到细胞质和细胞核中。沿着巴尔比亚尼环颗粒的线形长度，其结构有所不同，我们现已知道它们总是以相同的方向，以mRNA的5′端为引导穿过NPC。我们不知道是否其他的mRNA也是以5′端为引导进行核输出，但相信所有mRNP能够依据需要发生构型改变。

在细胞中产生的各种mRNA很少共享像输出信号的功能。然而，它们与许多相同的蛋白质结合，所以一种mRNA核输出的可能机制是一个或多个hnRNP蛋白含有核输出信号（NES）。根据这个模型，带有NES的蛋白质与特定mRNA结合，转运受体将会识别蛋白质中的NES。至少一些hnRNP蛋白含有NES，而其他蛋白质不包含NES。另外一些mRNA的核输出是由mRNA结合蛋白（而不是hnRNP蛋白）中所具有的信号介导的。

一般说来细胞中的mRNA只有在所有的RNA加工完成后才外运出核，但是一些病毒的RNA没有剪切内含子即已发生外运。HIV-1 RNA是理解这种情况的最好实例。和所有反转录病毒一样，HIV-1合成一系列重叠的mRNA。其中部分mRNA发生剪接。然而，全长的未被剪接的病毒mRNA必须进行核输出，因为这种形态的病毒mRNA用于产生新的感染性病毒颗粒，并且行使一个mRNA的功能指导合成部分HIV蛋白质。

HIV-1已形成一套独特的机制来确保未剪接病毒mRNA的外运。病毒Rev蛋白是由一个被剪接的病毒mRNA翻译产生的。HIV-1 Rev结合到称为Rev应答元件（RRE）的RNA序列上，RRE存在于未剪接的HIV-1 mRNA上。Rev具有富含亮氨酸的NES（见5.14 *细胞核中蛋白质的输出也有受体介导*）。这种NES介导单独的Rev蛋白质的输出，就像一个自由蛋白质与具有RRE的mRNA的结合。RRE对于Rev蛋白结合mRNA以及核输出是必需的。Rev介导的RNA核输出使用和蛋白质核输出相同的途径和因子，包括输出蛋白-1（见图5.30）。

如同蛋白质转运的调控是为了应答细胞外部信号和胞间信息传递的需要（见5.17 *可调控的细胞核运输*），mRNA的核输出同样是可调控的。调控mRNA核输出的最好例证是细胞对应激的应答，例如热应激。这种应答亦称为热休克反应（热激应答，heat shock response），当然在其他类型的应激中也会产生相似的应答（比如渗透压休克或将细胞暴露于有毒金属或高浓度乙醇环境中）。

作为热激应答的一部分，大多数的多聚腺苷酸化RNA并不向外运输，而是在细胞核内聚集。细胞中热激基因的表达上调，这种基因编码的蛋白质可以保护细胞免受可能的伤害。热激基因mRNA必须进行核输出。因此，热激发生后，部分mRNA的输出受到抑制，同时促进热激mRNA的高效输出。目前这种现象的发生机制还不清楚。可以确定的是热激产生的mRNA核输出的调节不需要新的蛋白质合成，并且在热激后的几分钟内就可以检测到这种变化。以上研究表明，通过诱导任一信号转导通路来修饰细胞核转运过程，从而使其选择性地输出应激应答的mRNA或者改变mRNA的生物合成，

使得只有应激应答的靶 mRNA 正确包装并被识别从而转运出细胞核。

5.22 hnRNP 从加工位点移动到 NPC

关键概念

- 前体 mRNA 加工完成后，mRNA 从染色体区域释放到染色质间区。
- mRNA 通过染色质间区扩散到细胞核周边。

mRNA 的转录和加工发生在细胞核内部，这就需要 hnRNP 从转录位点转移到细胞核周边的 NPC 上。转录位点也是大多数 mRNA 的加工位点。当 RNA 的长度足以使 RNA 聚合酶全酶脱离时，即发生 5′端加帽；在转录过程中剪接开始，3′端的产生是由于 RNA 链的断裂，那时 RNA 链仍然在延长。当发生剪切和 3′端加工有缺陷时，则不能发生 mRNA 的核输出。

我们认为 hnRNP 从转录和加工位点扩散穿过染色体间的空间到核孔复合体，然后转运出细胞核。RNA 存在于细胞核内空间，但染色体并没有充满其空间，如图 5.47（见图版）所示。通过对黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）唾液腺细胞的研究，支持了 hnRNP 穿过染色体空间扩散到 NPC 这一观点。这些细胞的细胞核都很大，因为它们包含了果蝇基因组的很多超量拷贝。细胞核内的 hnRNA 完成加工后，hnRNA 以相同的速率从各个方向向细胞核周边移动。移动的速率大约是 1μm/s，这种移动预期是一种被动扩散。分子马达运送“货物”的速率范围很大，从 1/10μm/s 到 10μm/s。然而，通常情况下分子马达运送“货物”是沿着微丝并具有很强的方向性的。

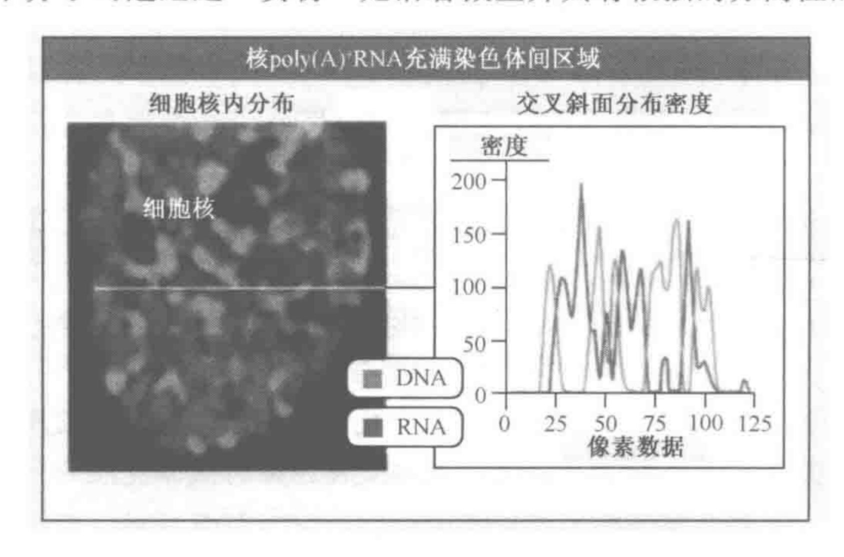


图 5.47 多聚腺苷酸 RNA（红色）和 DNA（绿色）用荧光染料染色。通过测定某条直线上红色和绿色信号的定位，可以看出 RNA 和 DNA 没有重叠（右图）；更确切点，mRNA 缠绕散布在 DNA 周围。图片和曲线图复制自 *Curr. Biol.*，vol. 9，Politz，J. C.，Movement of Nuclear…，pp. 285-291。Copyrighted 1999，获得 Elsevier 许可。图片由 Massachusetts 大学医学院的 Joan C. Ritland Politz 惠赠。

5.23 mRNA 的输出需要几种新因子

关键概念

- 现已鉴定出 mRNA 转运需要许多特异性因子。
- 既能与 mRNP 结合又能与核孔复合体结合的因子有利于介导 mRNA 的核输出。
- 其中的一个因子——Dbp5 是一种 ATPase，可能利用 ATP 水解产生的能量在转运过程中运输 mRNP 蛋白。

mRNA 的核输出要比蛋白质的跨核膜运输复杂得多。首先，mRNA 的核输出相对于蛋白质的入核和出核需要更多的蛋白因子。这些蛋白因子中没有一个与蛋白质转运的 Ran 或核转运中的核转运蛋白相关。其次，mRNA 的核输出过程与 mRNA 的转录以及加工过程是相互协调配合的，因此只有完全加工的 mRNA 才可以被转运出核。事实上，mRNA 核输出所必需的一些蛋白质很可能参与了 mRNA 的加工，核输出 mRNA 的加工必须是正确完成的。什么样的 mRNA 被认为是准备转运出核的？它是怎样被识别的？这些内容是目前研究的热点。

mRNA 的 5′端帽子结构对 mRNA 的核输出不是必要的，但是它却促进了这一过程。相反，mRNA 的剪接和 3′ 端的加工相互联合对核输出却是必要的。剪接和多聚腺苷酸化因子开始与 mRNA 结合甚至在它们被转录的过程中（见图 5.45）。图 5.48 表明多细胞动物剪接完成后，一个蛋白质复合体，被称为外显子结合复合体（EJC）仍然停留在连接点附近。这种复合体的存在可能是一个 mRNA 已经完成剪接的信号。然而，它并不表明是 mRNA 能够输出的充分条件，因为在一个内含子被移去之后，mRNA 需要一个 EJC，但是此时 mRNA 并不能转运出核，直到所有内含子都被剪切掉后 mRNA 才能进行核输出。

在 EJC 中的蛋白质中，有一个 mRNA 转运因子叫做 Aly，它是 RNA 结合蛋白 REF 家族的一员。Aly 与剪接体成分 UAP56 相互作用，Aly 也与结合在一些核孔蛋白重复 FG 上的 TAP 相互作用（见 5.10 核孔复合体由核孔蛋白组成）。TAP 与信使核糖核蛋白颗粒（mRNP，由成熟 mRNA 和 mRNA 结合蛋白组成的复合体）结合，同时也和核孔蛋白质相结合，可能在 mRNA 转运过程中起着与核转运蛋白如输出蛋白 1 类似的作用（见图 5.48）。因此，TAP 可被认为是 mRNP 的一个受体。在哺乳动物细胞中少量的 mRNA 核输出可能需要运输蛋白-1，但是大部分 mRNA 的核输出并不需要核转运蛋白。

在酵母细胞中大部分基因没有内含子。但是，酵母中与 Aly 同源的 Yral 对 mRNA 核输出具有重要的作用，并且被认为是起着相似作用的。在转录过程中，酵母中与 UAP56 同源的蛋白 Sub2 和 Yra1 一起被招募到 mRNA 上。首先 Sub2 和 Yra1 与蛋白复合体 THO 相互作用，这种蛋白复合体参与转录的延伸并且能够将它们转运到初始 mRNA 上。与图 5.48 所示的多细胞动物模型相似，TAP 同源物 Mex67 与 Yra1 相结合。

TAP 最初是在对梅森-菲泽（Mason-Pfizer）猴病毒（MPMV）的研究中被鉴定出来的，它是一种反转录病毒。虽然所有的反转录病毒都需要转运已剪接和未剪接的病毒 mRNA，但是大部分并不编码类似 HIV-1 Rev 的转运引导蛋白（见 5.14 从细胞核中输

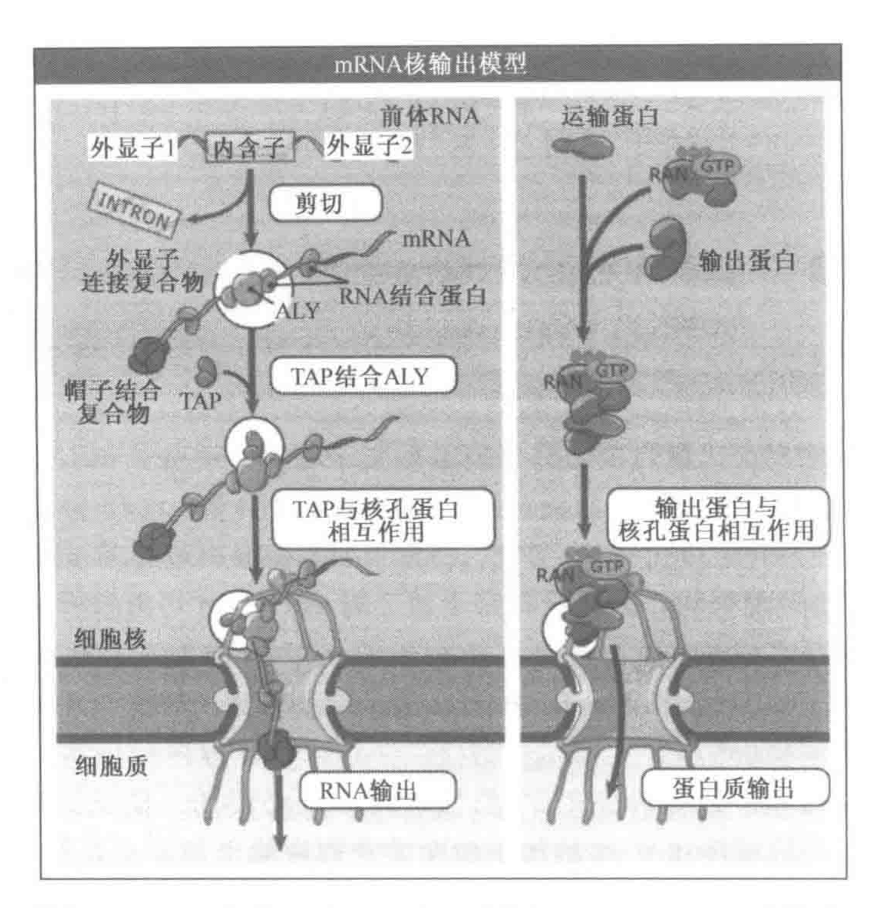


图 5.48　TAP 作为 mRNA 核输出受体与 mRNP 和 NPC 相结合。TAP 的功能与蛋白质运输中输出蛋白的功能相似。

出蛋白质同样是受体介导的)。转运未剪接 MPMV RNA 需要一个与 TAP 结合的短序列，这个短序列叫做组成型运输元件（CTE)。虽然类似 MPMV CTE 的序列并不是细胞中 mRNA 所具有的特征，但 TAP/Mex67 对大多数细胞 mRNA 的核输出起着重要的作用。TAP 是 RNA 转运过程中发挥作用的 NXF 蛋白质家族的一个成员。

mRNA 在转运出核之前都要对其剪切的正确性和加工的完全性进行检验。至少在酵母中，如果 mRNA 没有加工完全，那么 mRNA 始终靠近它们的转录位点。外切体是一种定位在转录位点附近并且降解加工错误的 mRNA 的核糖核酸酶复合物（见 MBIO：5-0012)。mRNA 从固定位点释放需要 3′端的精确加工和多聚腺苷酸化。

在细胞核内和穿过 NPC 后 mRNA-蛋白质复合物的组成并不相同。移除一些 mRNA 结合蛋白质是转运过程中的关键事件。在蛋白质运输过程中，位于核被膜两侧的蛋白质大致相同，并且 Ran GTPase 系统控制其方向性（见 5.15 Ran GTPase 控制细胞核运输的方向)，与蛋白质的运输相反，mRNA 核输出的方向是通过改变 mRNP 的成分来控制的，以便 mRNP 仅被细胞核中的运输物识别。另外，移除部分 mRNP 蛋白组分也许是翻译过程中核糖体和 mRNA 相互作用所必需的。当 mRNP 从 NPC 露出时即与核糖体相结合，这种结合促进核输出。然而，由于蛋白质合成抑制剂并不阻断 mRNA 的输出，因此核糖体的功能并不是核输出所必需的。

我们不能确定 mRNP 蛋白是如何解离的。但是至少有三种可能性。一种是某些 hnRNP 蛋白作为入核运输的蛋白质被核转运蛋白识别。核转运蛋白和这些蛋白质相结合引起蛋白质结构构象改变，使其从 mRNA 中释放。其他的蛋白质在转运结束后也许

只是简单地从 mRNP 中释放出来，在发生重新结合之前被转运返回细胞核内。但是，许多 mRNA 结合蛋白与 mRNA 结合太紧密以至于这些蛋白质不能有效地解离。

第三种可能性就是在酶的作用下使其与结合的 mRNA 解离。一种可能具有这种功能的酶是 Dbp5，它是酵母和哺乳动物中一种重要的 mRNA 输出蛋白。Dbp5 在核内和胞质间往返穿梭，并结合在 NPC 的胞质面纤维上。它是 DEAD 盒蛋白家族的成员之一，DEAD 盒蛋白家族具有保守序列 Glu(D)-Asp(E)-Ala(A)-Glu(D)和其他的保守结构域。DEAD 盒蛋白可以水解 ATP 并在 mRNA 代谢的许多方面具有重要作用。在体外，一些 DEAD 盒蛋白可以融合短双链 RNA 底物，其中的一种蛋白质可以将与 RNA 稳定结合的蛋白质解离。Dbp5 解离 mRNP 蛋白的模型如图 5.49 所示。在这个模型中，结合在 NPC 胞质面纤维上的 Dbp5 利用水解 ATP 产生的能量解离 mRNP 蛋白。

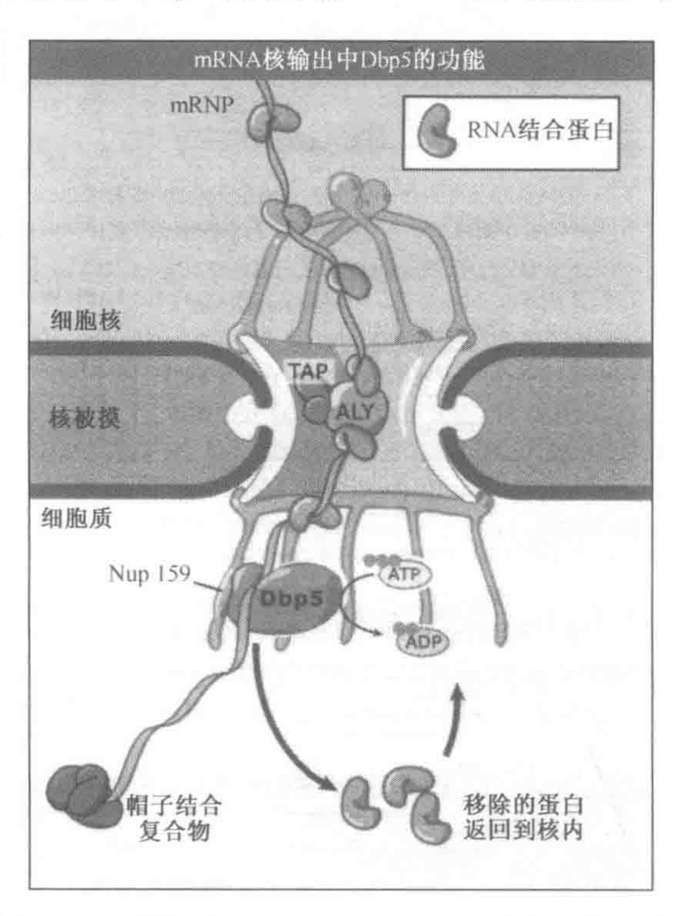


图 5.49 在 mRNA 核输出中，Dbp5 与 NPC 末端的纤维结合，Dbp5 利用 ATP 的能量移除 mRNP 蛋白。

5.24 U snRNA 复合体的输出、修饰、组装复合体和输入

关键概念

- 细胞核内产生的 U snRNA，核输出后经修饰和组装成为 U snRNP-RNA 蛋白复合体，再输入细胞核内参与 RNA 加工过程。

小核糖核蛋白颗粒（snRNP）是在 mRNA 前体剪接和其他核 mRNA 加工中起重要作用的 RNA-蛋白复合体（见MBIO：5-0013）。snRNA 中存在的 RNA——U snRNA

在细胞核内产生。然而，在哺乳动物细胞中功能性 snRNP 的形成需要 U snRNA 的核输出、在细胞质中修饰、与胞质中的蛋白质结合，以及 U snRNA 复合体的核输入，如图 5.50 所示。进入核内的 U snRNA 复合体最终装配成为 snRNP。

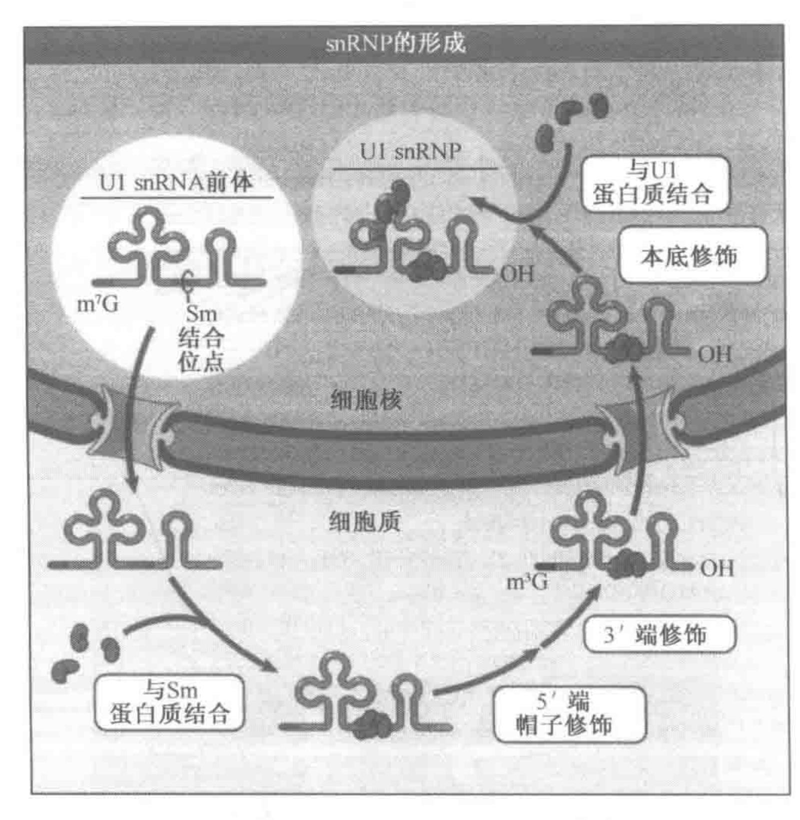


图 5.50 snRNA 的产生包括 U1 snRNA 前体的核输出、胞质中 snRNA 的修饰、以及 snRNA 进入核内发生进一步的修饰。

大多数的 U snRNA 由 RNA 聚合酶Ⅱ转录产生。类似 mRNA，也是由 RNA 聚合酶Ⅱ转录产生，U snRNA 带有单甲基的 5′帽子，但它们不同于缺少 poly A 尾巴的 mRNA。5′端帽子是 U snRNA 核输出的重要信号。当 RNA 进入细胞质，它的帽子被甲基化成为三甲基-G 帽子，同时 RNA 与一系列称为 Sm 的蛋白质的相互作用组装成为 RNA 蛋白复合体。这个三甲基帽子在剪接过程中发挥作用，而且这些蛋白质有利于 snRNP 形成整体的三维结构。这些复合体，称为 U snRNP，通过一个运输受体输入细胞核内，这种运输受体由一个接合体蛋白（snurportin）和 β-输入蛋白组成。帽子结合蛋白和 Sm 蛋白是复合体核输入的双重信号。

我们认为芽殖酵母细胞中不发生 U snRNA 的核输出。在酵母细胞中，U snRNA 是由 RNA 和输入蛋白在核内组装的。目前还不清楚为什么在哺乳动物细胞中形成有功能的 snRNP 参与输出和输入。

5.25 microRNA 的前体从细胞核输出，在细胞质进行加工

关键概念

- microRNA 在细胞核内通过转录产生，局部加工形成有发夹结构的前体，通过输出蛋白 V 输出细胞核，最终在胞质中加工成熟。

一种小 RNA，被称为 microRNA（miR），在基因表达的调控方面具有重要作用。miR 的长度为 21～22 个核苷酸，存在于包括动植物在内的多细胞生物中。人类细胞中 miR 的种类超过 250 种。miR 可调控许多生理途径，包括发育、分化、细胞程序性死亡（细胞凋亡）、器官形成和细胞增殖。miR 与胞质中的靶 mRNA 结合，从而阻断它们的翻译甚至促进这些生命过程的逆转。

miR 是 RNA 聚合酶Ⅱ的转录产物，在动物细胞中，miR 由 RNase Ⅲ 酶样复合体加工成一个大的前体而产生。编码 miR 的基因往往位于基因间隔区或是编码蛋白质基因的内含子区。通常，这种前体含有多个 miR，并且具有复杂的局部发夹结构。在核内，Drosha 酶加工前体产生发夹前体，每个发夹前体包含一个 miR，如图 5.51 所示。这些前体由输出蛋白 5 输出细胞核，类似于输出蛋白 t 输出 tRNA 的机制。这些前体一旦进入细胞质，就由 Dicer 酶（与 RNase Ⅲ 类似）与其他因子一起共同加工发夹结构，从而产生有功能的 miR（见MBIO：5-0014）。

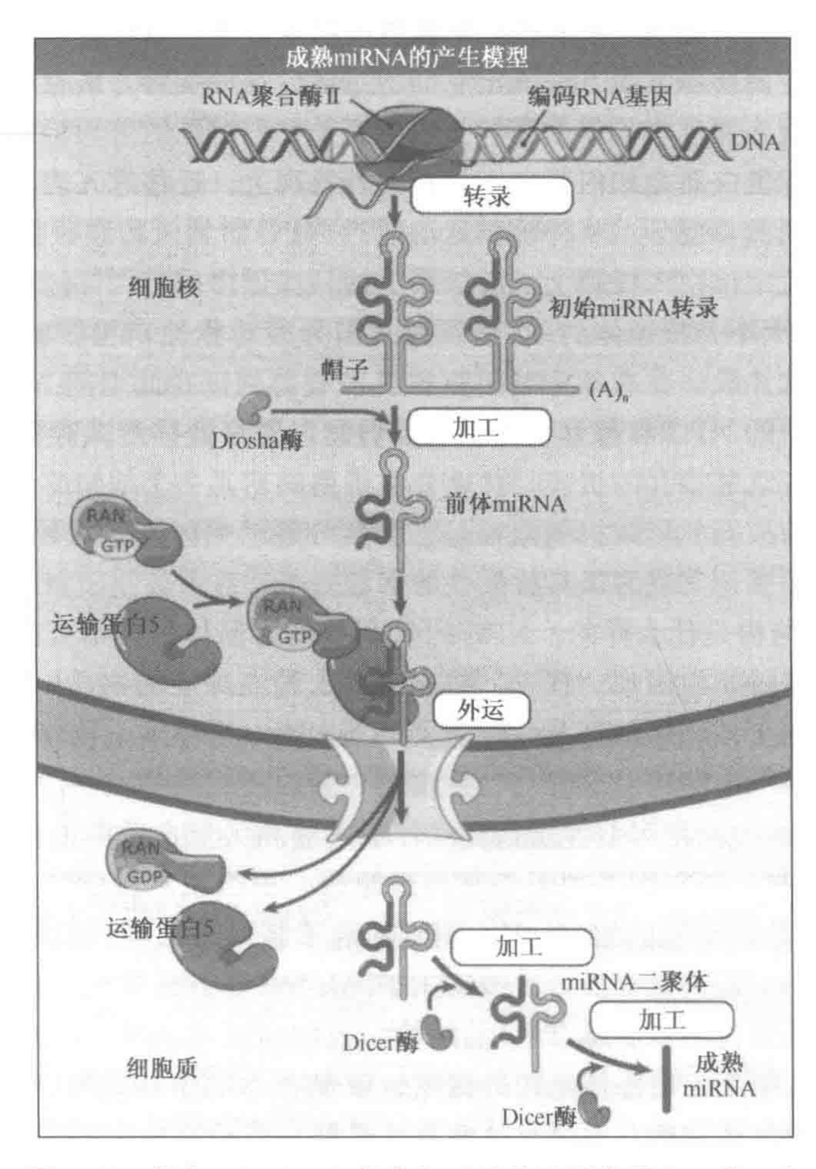


图 5.51　核内 microRNA 部分加工后外运到胞质中，进一步加工从而产生成熟 microRNA。

5.26 展望

细胞核的组构和细胞核运输是现代细胞核细胞生物学研究中最活跃的两个领域。有关细胞核的结构仍存有争议。细胞核内是否包含一个细胞核骨架？其作用是否类似细胞骨架一样组构细胞质并介导胞间运输？细胞核的一般提取物常显示一个由不完全组构的短细丝组成的不溶性的网络结构，但在活细胞核中的这些细丝的排列是什么？复制工厂是否是细胞核内的一个潜在的细胞核结构？如果是，在这些复制工厂上的 DNA 运转是处于动态的，而复制工厂则是固定的。那么，转录是否也发生于这些复制工厂？

利用免疫组织化学方法已陆续发现了许多细胞核亚单位或核体，可以预见未来将会有更多发现。这些核体的组织结构是什么；每一种结构由什么蛋白质组构；在什么条件下，是什么因素决定哪些蛋白质可以进入这些核体？尽管一些亚单位与 RNA 加工过程所需因子的储存有关，但我们现在还不清楚大分子的运动和大分子组装以及进出它们所在位点的机制。如同已经确定细胞核仁和核斑的组成一样，也许有可能纯化或丰富细胞核亚单位，采用蛋白质组学的方法确定它们的组成。这种实验方法有可能提供更多的有关它们功能的线索，并进一步促使我们去发展有关它们功能的可检验的假说。

我们也不清楚蛋白质是如何靶向定位在内外核膜上。迁移进入内质网 ER 只展示了这一靶向定位机制的一部分，从外核膜运动通过 NPC 的邻近的膜预定位在内核膜上的一些蛋白质，最后定位在内核膜上。内核膜上的一些蛋白质是否穿过核被膜的膜间腔？

一个 NPC 的大小是核糖体的 40 倍，而且因为其对称性，与核糖体相比，NPC 含有较少的不同多肽片段。在有丝分裂期核被膜破裂，所以在此期间 NPC 不能组装。这种未组装的不完全的 NPC 和部分核孔蛋白质仍然以亚复合体形式存在。那么当核被膜重新形成时，重新组装核孔的机理是什么？在细胞间期，一个细胞的 NPC 的数目加倍。那么再一次的新的核孔的形成机制是否与在有丝分裂结束时重新组装核孔的机制相同？核孔蛋白质的低丰度使其成为极具挑战性的问题。

NPC 的整体结构是什么样的？NPC 的 X 射线衍射晶体结构是否能被测定？有几个因素使这一问题变得非常困难。首先，结晶需要大量高纯度的物质，而 NPC 不易被纯化，甚至有来自缺少核纤层的环状片层就更不易纯化。第二，NPC 需要与核被膜相结合以维持其整体的三维结构。尽管在一些膜结合蛋白质的结构解析方面已有很大进展，但解析 NPC 的结构比测定可溶性蛋白质或较小的膜相关蛋白质的结构要困难得多。因为每个 NPC 通常被核膜包围，如果必须与膜结合，那么就不可能结晶出 NPC。此外，NPC 非常大，然而，已有可能解析大小相近的病毒蛋白质结构。最新进展是一些新的方法如高分辨率电子显微镜和质谱法被运用于测定 NPC 的细节结构，这方面的研究进展非常迅速。为了更进一步了解 NPC 的结构，我们需要将各种方法结合起来，包括亚复合物的纯化、X 射线衍射晶体结构的测定、亚复合物的体外组装、体内测定 NPC 组构，如荧光共振能量转移法。总之，这些方法最终可以绘制出一幅完整的 NPC 蛋白质图谱。

尽管过去数十年关于细胞核运输的研究进展很快，但是大分子如何通过 NPC 仍然是一个谜团。在运输过程中转运蛋白-运输物复合体发生了多少次接触？是什么介导了 NPC-转运蛋白质-运输物复合体的解聚？目前已提出多种通过 NPC 通道的转运模型，

而且每个模型均有一定的实验支持（见5.16 细胞核转运机制的多样模型）。其中一种模型认为当转运蛋白-运输物复合体穿过核孔向目标定位方向运动时经历了一个核孔蛋白亲和力的梯度递增。另一种观点认为苯丙氨酸-甘氨酸的重复单位相互作用形成一个疏水屏障，仅使转运蛋白能够唯一通过这个屏障，从而使之携带的运输物通过 NPC。目前还不知道 NPC 通道的化学环境为何不同于水溶性的核浆和细胞质，这种化学环境又是如何促进物质的转运。在这里，通过有效的生物物理方法来检测单个分子的运输可能提供了一些不完整的信息。

尽管已经鉴定了一些转运蛋白质运输的物质，但是现在还不能确定大多数转运蛋白质能识别的输入信号。这些信号是否总是初级序列或是有时可被识别的结构，还是类似于运输蛋白 t 识别 tRNA 的某些结构。蛋白质组学的方法也可能测定每一种转运蛋白所识别的全部运输物。在大多数情况下，运输是可被调控的，运输物修饰与否或运输物的可用性决定了转运是否发生。那么什么情况下在运输受体水平上调节转运？多细胞生物中有许多不同但又密切相关的转运蛋白，例如转运蛋白 α's。酿酒酵母有单个的转运蛋白 α。不同的转运蛋白 α's 在发育、分化或组织特异性功能上是否具有特殊的功能？裂殖酵母 *S. pombe* 有两种输入蛋白 α's，其中只有一种是必需的，这表明两种输入蛋白具有不同的功能。

mRNA 和核糖体亚基的运输较蛋白质和 tRNA 的运输复杂得多。已鉴定了许多特异性的 mRNA 和核糖体亚基的核输出因子，但其中一些的功能尚不明确。与 mRNA 一同输出的一些蛋白质在转录过程中和 RNA 聚合酶结合，并在 mRNA 合成后被转到 mRNA 上。在多细胞生物的细胞核中，至少有 20 种蛋白质与 mRNA 结合，但每种 mRNA 并不是结合所有这些蛋白质。这些蛋白质用于确定 mRNA 的加工位点或对核输出的 mRNA 进行包装。这些蛋白质使得 mRNP 具有什么样的整体结构？什么是这些 mRNA 结合蛋白的结合专一性？受到周围蛋白质的影响，这些蛋白结合到 mRNA 上是如何进行的？在核输出前是否有其他的蛋白质结合到 mRNA 结合蛋白上？它们都有什么样的功能？

在合成和核输出过程中，mRNP 的动力学特征是什么？在体外已分别研究了 mRNA 的翻译、5′端加帽、剪接和 3′端加工过程的细节。但是在体内这些生物学过程与 mRNA 输出是相互整合在一起的。这些过程是如何协调进行的？mRNA 准确完全加工的确切标志是什么？核内应该降解的 RNA 和核输出的 RNA 是如何区分的？一种可能性是剪切体加工完成之前与剪接组件的联系限制了 mRNP 的运动。一种动力学校对在这一过程中起作用，因为在特定时间内核酸外切酶降解没有从剪切体中释放的任何 mRNA。尽管还没有研究证明任一转运蛋白或 Ran-GTPase 系统直接参与 mRNP 的输出过程，但也不能确定它们是否参与或不参与。至于核糖体亚基的核输出，还不明确已准备离开核仁的核糖体是如何被识别，以及核糖体亚基从核仁运输到 NPC 的机制是什么。输出蛋白 1 在核糖体亚基的输出中发挥作用。然而，这些亚基比转运蛋白运输的其他物质要大得多，而且它们通过 NPC 孔道比多肽更复杂、需要更多的因子。

细胞核运输对于在细胞核内复制的许多病毒进入细胞核的过程发挥重要作用。有的病毒因为太大而不能完整地通过 NPC 而被部分分解，而小一些的病毒则可以完整地进入细胞核。病毒进入细胞核的靶向信息是什么？是否某些类型的病毒粒子是通过可溶性

受体或其他因子被识别？某些病毒太大以致于不能完整地进入细胞核，如腺病毒，但它们可通过与 NPC 的胞质面结合，使病毒 DNA 得以进入细胞核。重要的是定义病毒和 NPC 相互作用的决定因素。这一策略是针对大多数大病毒或只是某些大病毒？病毒基因组及其结合蛋白质释放到胞质后是否向 NPC 运动并穿过 NPC？是否有可能开发抗病毒化合物，使其靶向进入细胞核并影响病毒生命周期的某一阶段，而在此时不影响细胞运输的功能？

5.27 总结

细胞核是真核细胞的一个定义特征，包含了细胞的所有染色体。尽管细胞核缺少膜界限的亚单位，但细胞核具有明确的功能分区行使其特殊功能。细胞核由一双层膜所界定，膜上有 NPC 穿孔，而 NPC 是各种分子进出细胞核的唯一通道。细胞核的组织是动态的。复制和可能的 mRNA 转录发生在有限的位点，称为“工厂”。RNA 加工因子在贮存位点和转录位点之间循环。

小分子和分子质量小于 40kDa 的大分子可以扩散穿过 NPC，但转运更大的大分子则需要特殊的信号。大多数细胞核运输是由称为转运蛋白的一系列相关蛋白介导的，核转运蛋白可以识别特殊的信号并且与 NPC 相互作用。许多蛋白质被转运到核内，而另一些物质也被外运出核。

为了确保蛋白质转运过程的方向正确，细胞利用一种 GTPase 酶——Ran。Ran-GTP 在细胞核内，而 Ran-GDP 最初在细胞质中。细胞核内 Ran-GTP 和输入受体相互作用使被转运的蛋白质与该受体解离。同时 Ran 与输出受体和穿梭蛋白协调作用介导输出复合体的形成。受体在完成运输后回到最初的位置，一些受体可以作为其他受体的运输物质，而其他一些受体可独自进出细胞核。

细胞核运输的调控对于细胞控制基因表达和其他细胞特性是一个重要途径。许多转录因子只有在特殊的细胞信号作用或另一种刺激因子存在时才能被转移到核内。细胞核运输的机制大多数基于调控转运，包括转录因子和其他蛋白质被运输受体识别之前需要信号介导的修饰（磷酸化或去磷酸化）。有时蛋白质被作为复合体的一部分留在细胞质中。有时复合体其他部分的磷酸化导致转录因子的释放，转录因子从而被转运进入细胞核。

几乎所有的 RNA 都是在细胞核产生，在细胞质中发挥作用，因此 RNA 必须进行核输出。细胞核 RNA 只有在完全完成加工之后才会发生核输出。tRNA 和 microRNA 被核转运蛋白家族的成员转运出核，并与运输蛋白紧密相关。核糖体亚基在核仁组装，并在其他几个因子的作用下转运出核。mRNA 是在 mRNA 前体加工完成之后以 RNA-蛋白质复合体形式转运出核的。转录、mRNA 前体加工和 mRNA 的核输出是同步进行的。在转录过程中各种因子以及 RNA 聚合酶Ⅱ对于加工和核输出很重要，并且一些因子与 mRNA 一直相互结合直到核输出发生。mRNA 的核输出同样需要很多特异的 mRNA 输出因子。细胞核中存在多种精确的校对机制确保只有准确和完全加工的 RNA 才能被输出到细胞质。

参考文献

5.3 染色体占据不同的区域

综述

Gilbert, N., Gilchrist, S., and Bickmore, W. A., 2005. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int. Rev. Cytol.* v. 242 p. 283–336.

Parada, L., and Misteli, T., 2002. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* v. 12 p. 425–432.

Singer, R. H., and Green, M. R., 1997. Compartmentalization of eukaryotic gene expression: causes and effects. *Cell* v. 91 p. 291–294.

研究

Casolari, J. M., Brown, C. R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P. A., 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* v. 117 p. 427–439.

Fay, F. S., Taneja, K. L., Shenoy, S., Lifshitz, L., and Singer, R. H., 1997. Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). *Exp. Cell Res.* v. 231 p. 27–37.

Mathog, D., Hochstrasser, M., Gruenbaum, Y., Saumweber, H., and Sedat, J., 1984. Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in *Drosophila* salivary gland nuclei. *Nature* v. 308 p. 414–421.

Politz, J. C., Tuft, R. A., Pederson, T., and Singer, R. H., 1999. Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr. Biol.* v. 9 p. 285–291.

Zachar, Z., Kramer, J., Mims, I. P., and Bingham, P. M., 1993. Evidence for channeled diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J. Cell Biol.* v. 121 p. 729–742.

5.4 细胞核包含非膜界限的亚单位

综述

Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I., 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* v. 2 p. E107–12.

de Jong, L., Grande, M. A., Mattern, K. A., Schul, W., and van Driel, R., 1996. Nuclear domains involved in RNA synthesis, RNA processing, and replication. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* v. 6 p. 215–246.

Dundr, M. and Misteli, T., 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* v. 356 p. 297–310.

Gall, J. G., 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 16 p. 273–300.

Huang, S., and Spector, D. L., 1996. Dynamic organization of pre-mRNA splicing factors. *J. Cell. Biochem.* v. 62 p. 191–197.

Lamond, A. I., and Sleeman, J. E., 2003. Nuclear substructure and dynamics. *Curr. Biol.* v. 13 p. R825–R828.

Matera, A. G., 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* v. 9 p. 302–309.

Misteli, T., and Spector, D. L., 1998. The cellular organization of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 10 p. 323–331.

Olson, M. O., Dundr, M., and Szebeni, A., 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* v. 10 p. 189–196.

Scheer, U., and Hock, R., 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 11 p. 385–390.

Spector, D. L., 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 9 p. 265–315.

Spector, D. L., 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* v. 114 p. 2891–2893.

Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K., and Will, H., 1997. Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology* v. 198 p. 307–331.

研究

Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A. I., 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* v. 12.p. 1–11.

O'Keefe, R. T., Mayeda, A., Sadowski, C. L., Krainer, A. R., and Spector, D. L., 1994. Disruption of pre-mRNA splicing *in vitro* results in reorganization of splicing factors. *J. Cell Biol.* v. 124 p. 249–260.

Scherl, A., Couté, Y., Doné, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D., and Diaz, J. J., 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* v. 13 p. 4100–4109.

Verheggen, C., Lafontaine, D. L., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J. M.,

Bordonne, R., and Bertrand, E., 2002. Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J.* v. 21 p. 2736–2745.

5.5 某些加工过程发生在细胞核特定的区域，预示有潜在结构存在

综述

Cook, P. R., 1999. The organization of replication and transcription. *Science* v. 284 p. 1790–1795.

de Jong, L., Grande, M. A., Mattern, K. A., Schul, W., and van Driel, R., 1996. Nuclear domains involved in RNA synthesis, RNA processing, and replication. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* v. 6 p. 215–246.

Jackson, D. A., 2003. The principles of nuclear structure. *Chromosome Res* v. 11 p. 387–401.

Nickerson, J. A., Blencowe, B. J., and Penman, S., 1995. The architectural organization of nuclear metabolism. *Int. Rev. Cytol.* v. 162A p. 67–123.

Penman, S., 1995. Rethinking cell structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 92 p. 5251–5257.

Singer, R. H., and Green, M. R., 1997. Compartmentalization of eukaryotic gene expression: causes and effects. *Cell* v. 91 p. 291–294.

研究

Capco, D. G., Wan, K. M., and Penman, S., 1982. The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell* v. 29 p. 847–858.

Fay, F. S., Taneja, K. L., Shenoy, S., Lifshitz, L., and Singer, R. H., 1997. Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). *Exp. Cell Res.* v. 231 p. 27–37.

He, D. C., Nickerson, J. A., and Penman, S., 1990. Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* v. 110 p. 569–580.

Hozak, P., Jackson, D.A., and Cook, P.R., 1994. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J. Cell Sci.* v. 7 p. 2191–2202.

O'Keefe, R. T., Henderson, S. C., and Spector, D. L., 1992. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J. Cell Biol.* v. 116 p. 1095–1110.

5.6 细胞核的界限是核被膜

综述

Andersson, S. G. and Kurland, C. G., 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 2 p. 535–544.

Fahrenkrog, B., Stoffler, D., and Aebi, U., 2001. Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 259 p. 95–117.

Lang, B. F., Gray, M. W., and Burger, G., 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* v. 33 p. 351–397.

McFadden, G. I., 1999. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 2 p. 513–519.

Rout, M. P. and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.

研究

Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., and Ellenberg, J., 2001. Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J. Cell Biol.* v. 154 p. 71–84.

Maul, G. G., Price, J. W., and Lieberman, M. W., 1971. Formation and distribution of nuclear pore complexes in interphase. *J. Cell Biol.* v. 51 p. 405–418.

Stoffler, D., Goldie, K. N., Feja, B., and Aebi, U., 1999. Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* v. 287 p. 741–752.

Winey, M., Yarar, D., Giddings, T. H., Jr., and Mastronarde, D. N., 1997. Nuclear pore complex number and distribution throughout the *S. cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol. Biol. Cell* v. 8 p. 2119–2132.

5.7 核纤层在核被膜之下

综述

Broers, J. L., Hutchison, C. J., and Ramaekers, F. C., 2004. Laminopathies. *J. Pathol* v. 204 p. 478–488.

Dabauvalle, M. C. and Scheer, U., 1991. Assembly of nuclear pore complexes in *Xenopus* egg extract. *Biol. Cell* v. 72 p. 25–29.

Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K., and Spann, T. P., 2002.

Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* v. 16 p. 533–547.
Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K., and Wilson, K. L., 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 21–31.
Hutchison, C. J., Alvarez-Reyes, M., and Vaughan, O. A., 2001. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J. Cell Sci.* v. 114 p. 9–19.
Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F. R., and Gasser, S. M., 2004. The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.* v. 38 p. 305–345.
Wilson, K. L., Zastrow, M. S., and Lee, K. K., 2001. Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell* v. 104 p. 647–650.

5.8 大分子在细胞核和细胞质之间主动运输

研究

Feldherr, C. M., 1969. A comparative study of nucleocytoplasmic interactions. *J. Cell Biol.* v. 42 p. 841–845.

5.9 核孔复合体是双向通道

综述

Fahrenkrog, B., Stoffler, D., and Aebi, U., 2001. Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 259 p. 95–117.
Kessel, R. G., 1992. Annulate lamellae: a last frontier in cellular organelles. *Int. Rev. Cytol.* v. 133 p. 43–120.
Rout, M. P. and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.
Schwartz, T. U., 2005. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 15 p. 221–226.
Wischnitzer, S., 1970. The annulate lamellae. *Int. Rev. Cytol.* v. 27 p. 65–100.

研究

Akey, C. W., and Radermacher, M., 1993. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* v. 122 p. 1–19.
Arlucea, J., Andrade, R., Alonso, R., and Arechaga, J., 1998. The nuclear basket of the nuclear pore complex is part of a higher-order filamentous network that is related to chromatin. *J. Struct. Biol.* v. 124 p. 51–58.
Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., and Medalia, O., 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* v. 306 p. 1387–1390.
Fahrenkrog, B., Hurt, E. C., Aebi, U., and Panté, N., 1998. Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes. *J. Cell Biol.* v. 143 p. 577–588.
Goldberg, M. W., and Allen, T. D., 1993. The nuclear pore complex: three-dimensional surface structure revealed by field emission, in-lens scanning electron microscopy, with underlying structure uncovered by proteolysis. *J. Cell Sci.* v. 106 p. 261–274.
Goldberg, M. W., and Allen, T. D., 1996. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. *J. Mol. Biol.* v. 257 p. 848–865.
Hinshaw, J. E., Carragher, B. O., and Milligan, R. A., 1992. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* v. 69 p. 1133–1141.
Jarnik, M., and Aebi, U., 1991. Toward a more complete 3-D structure of the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* v. 107 p. 291–308.
Rout, M. P., and Blobel, G., 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* v. 123 p. 771–783.
Yang, Q., Rout, M. P., and Akey, C. W., 1998. Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* v. 1 p. 223–234.

5.10 核孔复合体由核孔蛋白组成

综述

Conti, E. and Izaurralde, E., 2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 13 p. 310–319.
Doye, V., and Hurt, E.C., 1995. Genetic approaches to nuclear pore structure and function. *Trends Genet.* v. 11 p. 235–241.
Panté, N., 2004. Nuclear pore complex structure: unplugged and dynamic pores. *Dev. Cell* v. 7 p. 780–781.
Rout, M. P., and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.
Suntharalingam, M., and Wente, S. R., 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell* v. 4 p. 775–789.

研究

Amberg, D. C., Goldstein, A. L., and Cole, C. N., 1992. Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *S. cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev.* v. 6 p. 1173–1189.

Fahrenkrog, B., Aris, J. P., Hurt, E. C., Panté, N., and Aebi, U., 2000. Comparative spatial localization of protein-A-tagged and authentic yeast nuclear pore complex proteins by immunogold electron microscopy. *J. Struct. Biol.* v. 129 p. 295–305.

Kadowaki, T., Zhao, Y., and Tartakoff, A. M., 1992. A conditional yeast mutant deficient in mRNA transport from nucleus to cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 89 p. 2312–2316.

Miller, B. R., and Forbes, D. J., 2000. Purification of the vertebrate nuclear pore complex by biochemical criteria. *Traffic* v. 1 p. 941–951.

Rabut, G., Doye, V., and Ellenberg, J., 2004. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat. Cell Biol.* v. 6 p. 1114–1121.

Rout, M. P., and Blobel, G., 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* v. 123 p. 771–783.

Strawn, L. A., Shen, T., Shulga, N., Goldfarb, D. S., and Wente, S. R., 2004. Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat. Cell Biol.* v. 6 p. 197–206.

Yang, Q., Rout, M. P., and Akey, C. W., 1998. Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* v. 1 p. 223–234.

5.11 蛋白质通过核孔选择性运入细胞核

研究

Dingwall, C., Sharnick, S. V., and Laskey, R. A., 1982. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* v. 30 p. 449–458.

Feldherr, C. M., Kallenbach, E., and Schultz, N., 1984. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* v. 99 p. 2216–2222.

5.12 细胞核定位序列使蛋白质定位到细胞核

研究

Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E., 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* v. 39 p. 499–509.

5.13 细胞质NLS 受体介导细胞核蛋白进入细胞核

综述

Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T., and Adam, S. A., 2004. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 505–514.

Harel, A., and Forbes, D. J., 2004. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol. Cell* v. 16 p. 319–330.

Mosammaparast, N., and Pemberton, L. F., 2004. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 547–556.

研究

Adam, S. A., Marr, R. S., and Gerace, L., 1990. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 807–816.

Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J., 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* v. 94 p. 193–204.

Goldfarb, D. S., Gariapy, J., Schoolnik, G., and Kornberg, R. D., 1986. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* v. 322 p. 641–644.

Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A., and Hartmann, E., 1994. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* v. 79 p. 767–778.

Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., and Laskey, R. A., 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* v. 377 p. 246–248.

Moore, M. S. and Blobel, G., 1992. The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* v. 69 p. 939–950.

Vodicka, M. A., Koepp, D. M., Silver, P. A., and Emerman, M., 1998. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* v. 12 p. 175–185.

5.14 从细胞核中输出蛋白质同样是受体介导的

综述

Ullman, K. S., Powers, M. A., and Forbes, D. J., 1997. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* v. 90 p. 967–970.

研究

Fritz, C. C., and Green, M. R., 1996. HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr. Biol.* v. 6 p. 848–854.

Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K., 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* v. 90 p. 1041–1050.

Wolff, B., Sanglier, J. J., and Wang, Y., 1997. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type I (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* v. 4 p. 139–147.

5.15 Ran GTPase 控制细胞核运输的方向

综述

Bayliss, R., Corbett, A. H., and Stewart, M., 2000. The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. *Traffic* v. 1 p. 448–456.

Dasso, M., 2002. The Ran GTPase: theme and variations. *Curr. Biol.* v. 12 p. R502–R508.

研究

Kalab, P., Weis, K., and Heald, R., 2002. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* v. 295 p. 2452–2456.

5.16 基于细胞核转运机制的多个模型

综述

Becskei, A., and Mattaj, I. W., 2005. Quantitative models of nuclear transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 17 p. 27–34.

Rout, M. P., and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.

研究

Ben-Efraim, I., and Gerace, L., 2001. Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J. Cell Biol.* v. 152 p. 411–417.

Ribbeck, K., and Gorlich, D., 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* v. 20 p. 1320–1330.

Yang, W., Gelles, J., and Musser, S. M., 2004. Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 101 p. 12887–12892.

5.17 可调控的细胞核运输

综述

Hood, J. K., and Silver, P. A., 2000. Diverse nuclear transport pathways regulate cell proliferation and oncogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1471 p. M31–M41.

Kaffman, A., and O'Shea, E. K., 1999. Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 291–339.

Poon, I. K., and Jans, D. A., 2005. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* v. 6 p. 173–186.

5.18 多种RNA从细胞核输出

研究

Dworetzky, S. I., and Feldherr, C. M., 1988. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* v. 106 p. 575–584.

Hamm, J., Dathan, N. A., and Mattaj, I. W., 1989. Functional analysis of mutant *Xenopus* U2 snRNAs. *Cell* v. 59 p. 159–169.

Hamm, J., and Mattaj, I. W., 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* v. 63 p. 109–118.

Jarmolowski, A., Boelens, W. C., Izaurralde, E., and Mattaj, I. W., 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* v. 124 p. 627–635.

5.19 核糖体亚基在核仁中装配，通过输出蛋白1输出

综述

Johnson, A. W., Lund, E., and Dahlberg, J., 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* v. 27 p. 580–585.

研究

Bataille, N., Helser, T., and Fried, H. M., 1990. Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 1571–1582.

Ho, J. H., Kallstrom, G., and Johnson, A. W., 2000. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell Biol.* v. 151 p. 1057–1066.

Moy, T. I., and Silver, P. A., 1999. Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain

nucleoporins. *Genes Dev.* v. 13 p. 2118–2133.
Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D., 2004. A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev.* v. 18 p. 196–209.

5.20 tRNA通过专一的输出蛋白外运

研究

Arts, G. J., Fornerod, M., and Mattaj, I. W., 1998. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* v. 8 p. 305–314.
Jarmolowski, A., Boelens, W. C., Izaurralde, E., and Mattaj, I. W., 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* v. 124 p. 627–635.
Lund, E., and Dahlberg, J. E., 1998. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* v. 282 p. 2082–2085.
Shaheen, H. H.,and Hopper, A. K., 2005. Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 102 p. 11290–11295.
Takano, A., Endo, T., and Yoshihisa, T., 2005. tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* v. 309 p. 140–142.

5.21 信使RNA以RNA-蛋白质复合体的形式输出细胞核

综述

Aguilera, A., 2005. mRNA processing and genomic instability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* v. 12 p. 737–738.
Daneholt, B., 1997. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* v. 88 p. 585–588.
Daneholt, B., 1999. Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore. *Curr. Biol.* v. 9 p. R412–R415.
Fukumori, T., Kagawa, S., Iida, S., Oshima, Y., Akari, H., Koyama, A. H., and Adachi, A., 1999. Rev-dependent expression of three species of HIV-1 mRNAs. *Int. J. Mol. Med.* v. 3 p. 297–302.
Nakielny, S., and Dreyfuss, G., 1999. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* v. 99 p. 677–690.
Pollard, V. W.,and Malim, M. H., 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 52 p. 491–532.
Saguez, C., Olesen, J. R., and Jensen, T. H., 2005. Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 17 p. 287–293.

研究

Choi, Y. D., and Dreyfuss, G., 1984. Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 7471–7475.
Mehlin, H., Daneholt, B., and Skoglund, U., 1992. Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography. *Cell* v. 69 p. 605–613.
Pinol-Roma, S., Choi, Y. D., Matunis, M. J., and Dreyfuss, G., 1988. Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA binding proteins. *Genes Dev.* v. 2 p. 215–227.
Saavedra, C., Tung, K.-S., Amberg, D. C., Hopper, A. K., and Cole, C.N., 1996. Regulation of mRNA export in response to stress in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* v. 10 p. 1608–1620.
Visa, N., Izaurralde, E., Ferreira, J., Daneholt, B., and Mattaj, I. W., 1996. A nuclear cap–binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J. Cell Biol.* v. 133 p. 5–14.

5.22 hnRNP 从加工位点移动到NPC

研究

Politz, J. C., Tuft, R. A., Pederson, T., and Singer, R. H., 1999. Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr. Biol.* v. 9 p. 285–291.
Zachar, Z., Kramer, J., Mims, I. P., and Bingham, P. M., 1993. Evidence for channeled diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J. Cell Biol.* v. 121 p. 729–742.

5.23 mRNA 的输出需要几种新因子

综述

Cullen, B. R., 2003. Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* v. 116 p. 587–597.
de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P., 1999. Unwinding RNA in *S. cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* v. 24 p. 192–198.
Jensen, T. H., Dower, K., Libri, D., and Rosbash, M., 2003. Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol. Cell* v. 11 p. 1129–1138.

研究

Braun, I. C., Rohrbach, E., Schmitt, C., and Izaurralde, E., 1999. TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *EMBO J.* v. 18 p. 1953–1965.

Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T. H., 2001. Quality control of mRNA 3′-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* v. 413 p. 538–542.

Hodge, C. A., Colot, H. V., Stafford, P., and Cole, C.N., 1999. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of *xpo1-1* cells. *EMBO J.* v. 18 p. 5778–5788.

Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., and Pyle, A. M., 2000. The DExH protein NPH-II is a processive and directional motor for unwinding RNA. *Nature* v. 403 p. 447–451.

Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., and Pyle, A. M., 2001. Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science* v. 291 p. 121–125.

Kang, Y., and Cullen, B. R., 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev.* v. 13 p. 1126–1139.

Lei, E. P. and Silver, P. A., 2002. Intron status and 3′-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes Dev.* v. 16 p. 2761–2766.

Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., and Jensen, T.H., 2002. Interactions between mRNA export commitment, 3′-end quality control, and nuclear degradation. *Mol. Cell Biol.* v. 22 p. 8254–8266.

Strässer, K. et al., 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* v. 417 p. 304–308.

Tseng, S. S., Weaver, P. L., Liu, Y., Hitomi, M., Tartakoff, A. M., and Chang, T. H., 1998. Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)+ RNA export. *EMBO J.* v. 17 p. 2651–2662.

5.24 U snRNA复合体的输出、修饰、组装复合体和输入

研究

Hamm, J., and Mattaj, I. W., 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* v. 63 p. 109–118.

Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., and Luhrmann, R., 1998. Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* v. 17 p. 4114–4126.

Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A., and Mattaj, I. W., 1997. Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *EMBO J.* v. 16 p. 6783–6792.

5.25 microRNA 的前体从细胞核输出，在细胞质进行加工

综述

Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* v. 431 p. 350–355.

Kim, V. N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 376–385.

Zamore, P. D., and Haley, B., 2005. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* v. 309 p. 1519–1524.

程永功 译

第6章 染 色 体

Benjamin Lewin
Founding Publisher/Editor，Cell Press and Virtual Text；Author of *Genes*

本章概要

6.1 导言

在所有的细胞中，遗传物质均以压缩状态存在于一个有限的空间内。细菌中的遗传物质在细胞内形成一个特定的团状区域，被称为拟核(nucleoid)。真核细胞的遗传物质在细胞分裂间期以染色质(chromatin)的形式存在于核内。染色质包装是很灵活的，在真核生物细胞周期中会发生变化。间期的染色质到了分裂期(有丝分裂或减数分裂)会变得更为紧密，这时单个染色体(chromosome)变成很容易区分的可见实体。

染色体是在细胞分裂中保证遗传物质分离的装置，与此相伴随的一个关键性结构是在光镜下可见的、以缢痕形态存在于染色体长轴上的着丝粒(centromere)。在高度精细的结构水平上，可见着丝粒包含一个与微管相连接的动粒(kinetochore)结构。真核细胞的染色体通常包含了很长的线性 DNA 组分。染色体上还有另一个重要的结构——端粒，它可以稳定 DNA 末端，并且通过特殊的延伸机制解决末端复制的困难问题。

DNA 的密度很高，在细菌类核中是 10mg/mL，在真核中为 100 mg/mL，在 T4 噬菌体头部则大于 500 mg/mL。这样的浓度相当于一块高黏度的胶，有利于蛋白质识别 DNA 上相应的结合位点。DNA 所处的不同活性状态(例如复制和转录时的活性状态)必须在这个有限空间内得以保障，遗传物质的组成形式也必须适应于其非活性和活性状态的转变。图 6.1 给出了基因组的大小范围以及根据 DNA 含量的巨大变化对染色体进行区分的要点。

染色体大小的巨大变化				
生物	基因组大小/Mb	单倍体染色体数	染色体长度的范围(Mb DNA)	总基因数
大肠杆菌	4.6	1	4.6	4401
芽殖酵母	12.1	16	(0.2)～1.5	6702
黑腹果蝇	165	4	(1.3)～28	14 399
水稻	389	12	24～45	37 544
小鼠	2500	20	60～195	26 996
人	2900	23	45～245	246 194

图 6.1 单倍体基因组中染色体数目和染色体大小的巨大变化。

处于伸展状态的 DNA 分子，其长度范围远远超过了容纳它的空间尺度，它的浓缩状态源于其结合的一类碱性蛋白质，这些蛋白质的正电荷中和了核酸的负电荷。这些蛋白质将 DNA 压缩为一个紧密螺旋化的结构，决定了由此形成的核蛋白复合体(nucleoprotein complex)的结构。因此，与人们印象中 DNA 的延展性双螺旋结构形象相比，DNA 在结构上弯曲、折叠而形成一种更致密的形式，是一种毫不例外的规律。

多数染色质有相对分散的外观，被称为常染色质(euchromatin)，它包含了活性基因；有些染色质区域则是包装得更为紧密的结构，称为异染色质(heterochromatin)，在遗传上

是无活性的。

那么,染色质的一般性结构是什么样的呢? 活性和无活性序列之间有何不同? 遗传物质总体上的高度包装比直接表明,DNA 并不能直接包装到最终的染色质结构,而一定是被分级装配的。有一些涉及包装专一性的问题:DNA 被包装为特定的形式还是在基因组每个拷贝间都有不同? 当 DNA 片段被复制或转录时包装形式如何改变?

在真核细胞里染色质的基本亚单位(核小体,nucleosome)是以相同的方式构成的。这样的核小体包含大约 200bp 的 DNA,与小型碱性蛋白八聚体组装,形成珠状结构。这些蛋白质就是组蛋白(histone),它们形成一个内核,DNA 存在于其表面。在间期或有丝分裂期,核小体无论对于常染色质还是异染色质都是不变的成分。核小体赋予了染色体包装的第一级结构,它将 67nm 长的 DNA 包装成直径为 11nm 的小体,其组分和结构都有明显的特点——核小体的线性长串组成了"10nm 纤维"。

染色质包装的二级结构是一系列核小体缠绕成的螺旋状排列结构,组成直径约 30nm 的纤维状结构,这种结构既存在于间期染色质也存在于有丝分裂期染色体中。这使得核小体链的每单位长度压缩了 6~7 倍。这个纤维结构需要一些额外的蛋白质,但是人们还没有将其确定。

染色体形成中的最后包装比率决定于组装的三级结构,即 30nm 纤维自身的包装。常染色质相应于 30nm 纤维聚缩了大约 50 倍以上。常染色质与包装为有丝分裂期染色体的形态是周期性交替的,后者进一步紧密地压缩 5~10 倍。异染色质与有丝分裂时的染色体具有大体上相同的包装密度。

染色质物质质量相当于包含了两倍的蛋白质量,也相当于两倍的 DNA 量(也就是说,在染色质的质量组成中,蛋白质和 DNA 的比例大体为 1∶1——译者注)。蛋白质在核小体中的质量几乎占到了一半,RNA 的质量小于 DNA 的 10%,大量的 RNA 包含了仍旧与模板 DNA 结合的初期转录物。

染色质结构的变化与其同额外蛋白质的结合或者已存在的染色体蛋白质的修饰相关。复制和转录都需要伸展开的 DNA,因此必然有一个结构展开过程,使得相关的酶能作用于 DNA。这可能就需要染色体组织的各个水平上的变化。

非组蛋白包括除了组蛋白以外的所有染色质蛋白质。它们在各个组织和物种间的变异更多,但相对于组蛋白,它们在质量上只占很小的比例。由于非组蛋白中也包括数目很多的蛋白质,因而在数量上,任何一种单独的蛋白质都大大少于任何组蛋白。

6.2 染色质可分为常染色质和异染色质

关键概念

- 单个的染色体只有在有丝分裂时才是可见的。
- 在间期时,大部分的染色质是以常染色质形式存在的,常染色质包装的紧密程度远小于有丝分裂时的染色体。
- 异染色质的区域在间期时也保持紧密的包装。

每一个染色体包括一个单个的、很长的而且是双重的 DNA。这个 DNA 折叠成了一条纤维,贯穿了整条染色体。所以在说明间期染色质和有丝分裂染色体的结构时,我们必

须解释将一个单个的、相当长的 DNA 分子包装成一种可被转录和复制，以及能周期性地或多或少地被压缩的一种形式。

单个的真核染色体只有在细胞分裂过程中可见，它们中的每一个都形成一个紧密的单位。图 6.2 是一对姐妹染色单体的电镜照片，拍摄于有丝分裂中期(姐妹染色单体是由于前期的复制而产生的子代染色体，在有丝分裂的这一时期还一直结合在一起)。每一个姐妹染色单体都是由直径约 30nm 的纤维组成，有一个多节的外表。在染色体中 DNA 的浓缩程度是间期染色质的 5～10 倍。

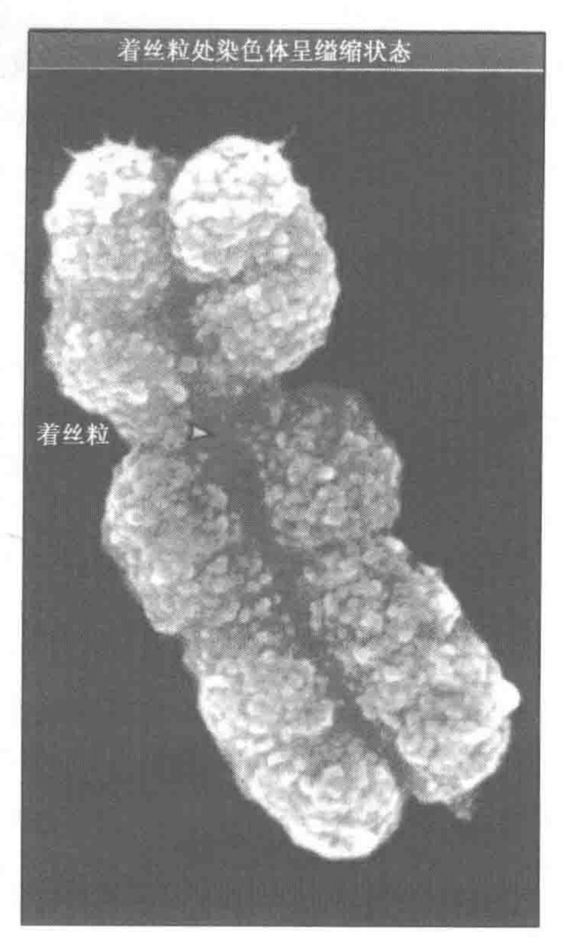


图 6.2　有丝分裂中一对姐妹染色单体的每一条均包含一根染色质纤维，紧密压缩成了染色体结构。照片由 Harvard 大学的 Daniel L. Hartl 惠赠。

但是，在真核细胞的大部分生命周期中，它的遗传物质占据了它的细胞核区域，其中单个染色体难以辨认。构成染色质的 30nm 纤维与构成有丝分裂染色体的纤维是相似或相同的。

染色质可被分为两种类型的物质，它们可从图 6.3 的细胞核切片中看出：

(1)在大部分区域，染色质纤维包装的压缩程度远远小于有丝分裂染色体。这部分染色质被称作常染色质。从图 6.3 中可以看出，在细胞核区域，它表现得相对分散，并且占据了细胞核的大部分区域。

(2)染色质上的一些区域中纤维的压缩程度

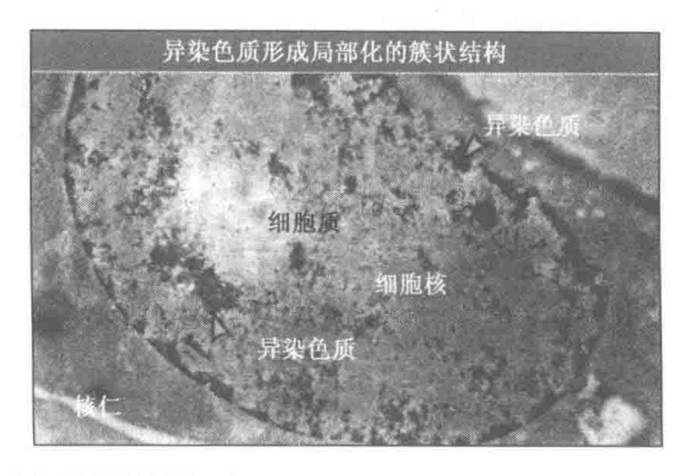


图 6.3　跨细胞核的薄层切片，以孚尔根样物质(Feulgen-like material)染色，显示异染色质是位于核仁和核膜附近的簇状浓缩区域。照片由 Centre National de la Recherche Scientifique 的 Edmund Puvion 惠赠。

高，表现出与有丝分裂时期的染色体相似的状态，这部分染色质被称作异染色质。典型的异染色质位于着丝粒，但是也可在其他位置出现。在整个细胞周期中，它在压缩程度上变

化相当少。在图 6.3 中可以看到，它形成了一系列分离的团块，但是，各种异染色质区域也经常聚集成一个染色较深的染色中心(chromocentre)(这一描述适用于那些一直是处于异染色质状态的区域，称为结构异染色质；另外，还有另一类的异染色质，称为兼性异染色质，是指常染色质上的一些可转变为异染色质状态的区域)。

相同的染色质纤维在常染色质和异染色质之间是连续延伸的，显示出这些状态代表了遗传材料的不同聚缩程度。同样的，常染色质区域在间期和在有丝分裂期也存在着不同的聚集度。所以遗传材料是以一种在染色质上的存在状态可发生变化的方式组织起来的，进而使其在间期和分裂期发生包装程度上的周期性改变。我们将在本章的后面对这些状态的分子基础进行讨论。

遗传材料的结构状态与它的活性是联系在一起的。结构异染色质的一般特性如下：

(1)永久性地处于聚缩状态。

(2)常常由一些无转录活性的 DNA 序列的多次重复序列组成。

(3)该区域的基因密度远远小于常染色质，转位到这一区域或这一区域附近的基因通常会失活。

(4)可能由于其聚缩状态，它的复制比常染色质晚，而且基因重组的几率也小。

我们有一些分子标记可用来反映 DNA 和蛋白质组分的变化(见 6.31 异染色质的性质依赖于与组蛋白的相互作用)。这些分子标记包括降低组蛋白的乙酰化水平，增加一种组蛋白的甲基化水平，以及引起 DNA 上胞嘧啶碱基的高度甲基化(见图 6.72)。这些分子的变化引起了遗传物质的凝集，而这导致了分子的失活。

尽管有活性的基因存在于常染色质上，但是在任何时候，它们中都只有很小一部分序列被转录。所以对于基因的表达来说，定位于常染色质上只是其必要条件，而非充分条件。

6.3 染色体具有显带特性

关键概念

- 某些染色技术可以使染色体显带，即使其形成具有一系列条纹的带型，称为 G 带。
- G·C碱基区域的带(band)，比带间(interband)的显色暗。
- 在富含G·C的带间，基因比较密集。

由于染色质的分散状态，我们不能直接确定它的组织特性。但是，我们可以探求有丝分裂期染色体的结构是不是有条理的。特定的序列是否一直位于特定的位点？或者，将染色质纤维折叠成其整体结构的过程是一个更加随机的事件？

在染色体水平上，每条都拥有自己与众不同的可重复再现的超级结构。当用特定的手段处理后，使用化学染料吉姆萨(Giemsa)染色，染色体就会呈现一系列的“G 带”。图 6.4 显示的就是人类染色体组 G 带显色例子。

在此技术诞生之前，染色体只能按照其总体大小和着丝粒的相对位置进行区分。G 带显色使得每条染色体可以按照它们特有的带型进行区分。借助这种带型，我们可以通过与原有的二倍体染色体组进行比较来发现从一条染色体向另一条染色体的转座(translocation)。图 6.5 显示的是人类 X 染色体的 G 带带型分布图——带的结构比较

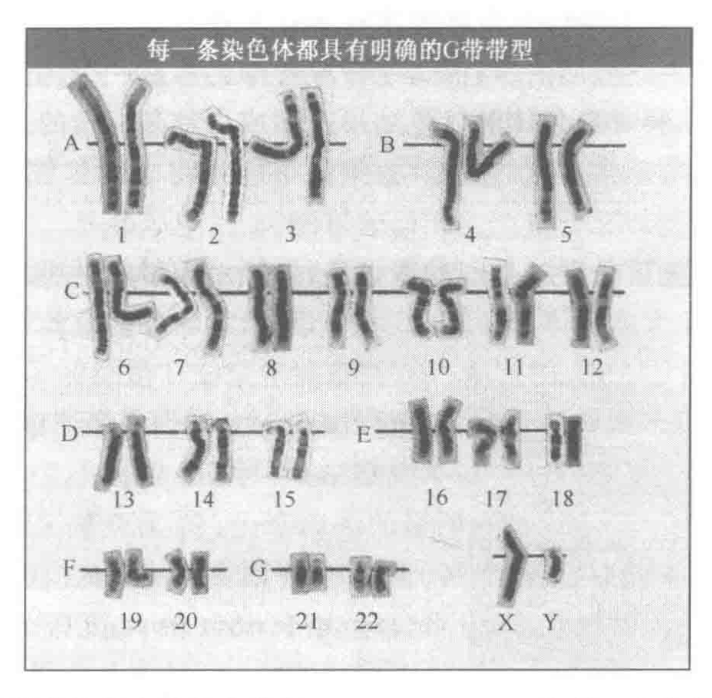


图 6.4　G 带分染技术使染色体组(chromosome set)的每一个染色体成员形成特征性的横向系列带谱。照片由 Washington 州立大学—Spokane 的 Lisa Shaffer 惠赠。

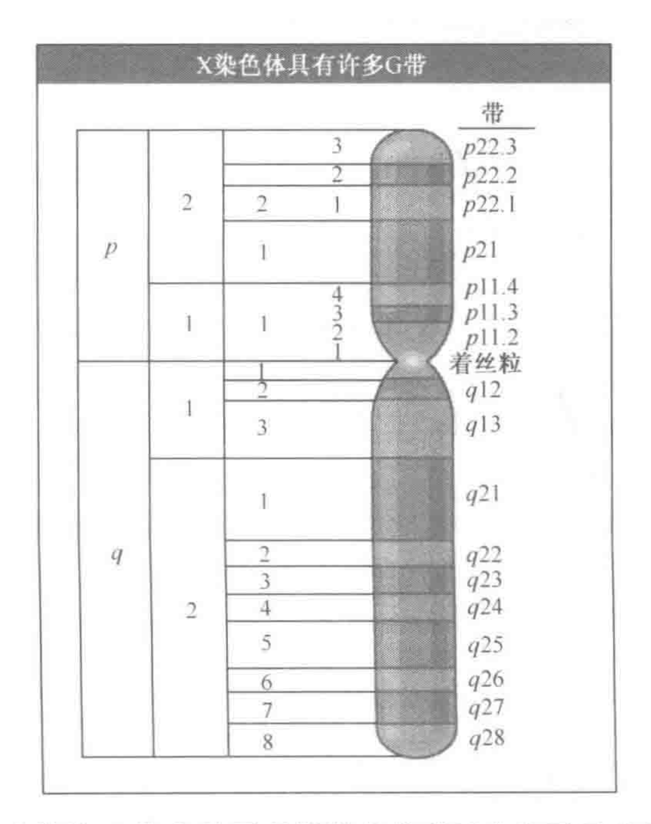


图 6.5　人类的 X 染色体可以根据其带型区分为不同的区域(带，Band)。染色体的短臂是 p，长臂是 q；每个臂分为若干区，区又由多条带组成。此图所示的是低分辨率分染结果；在高分辨率分染技术中，一些带被进一步分开，形成更细的带和带间。例如，$p21$ 可被细分为 $p21.1$、$p21.2$ 和 $p21.3$。

大，每条约包括 10^7 bp 的 DNA，其中可能含有数百个基因。

显带技术具有巨大的应用价值，但是显带原理却仍然是一个谜。就目前的认识，如果不进行一定的处理，染料对染色体的显色结果或多或少都是一致的。因此，带型的产生依赖于一系列可以改变染色体反应的处理（据推测可能是将非带区域与染料结合的组分移除）。但是，不同的处理却又可以产生相似的带型。

现在已知的唯一能区分带与带间的特点是，带相对于带间具有较低的G·C含量。如果一条长约 100Mb 的大染色体上含有约 10 个带，就意味着染色体被分为低G·C含量与高G·C含量相间的长约 5Mb 的片段。基因趋向于定位在带间区域（与 mRNA 杂交的试验证明了这一点）。所有这些都表明，染色体倾向于大范围的序列依赖性组织形式。

人类基因组序列信息支持这一基本观察结果。图 6.6 显示，当基因组被分成小份额（tranch）时，不同份额的G·C含量有明显的波动变化。哺乳动物基因组的平均G·C含量一般为 41%，一些区域可以低至 30%，而另一些则高达 65%。而检测大份额序列时，G·C含量并没有明显的差异。G·C含量大于 43% 的片段区域平均大小为 200～250 kb。这清晰地表明，带-带间结构并不能代表G·C含量大小相间的同源性片段。虽然带中确实含有丰富的低G·C部分，基因集中位于高G·C含量的区域，但是我们还未能理解清楚G·C含量是如何影响染色体结构的。

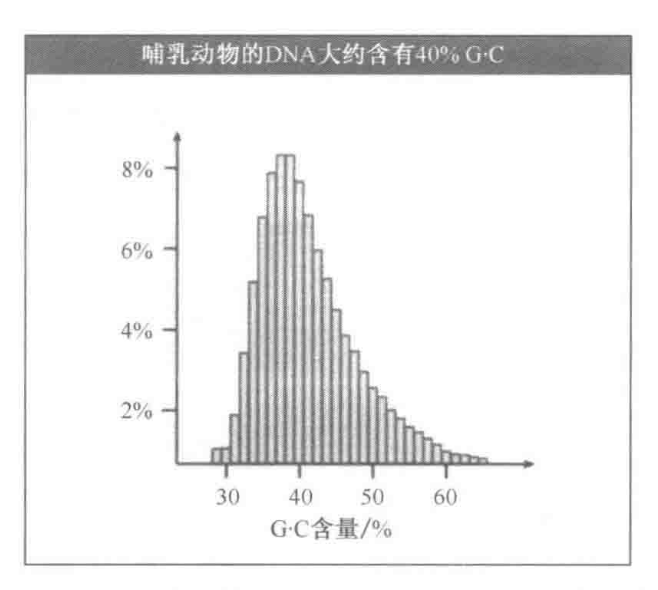


图 6.6　在一个短距离中有很大的 G·C 含量波动，每一条柱都表现了给定 G·C 含量的 20kb 片段的百分数。

6.4　真核生物 DNA 含有结合到染色体支架上的袢环和结构域

关键概念

- 间期染色质 DNA 形成了以大约 85kb 独立结构域为单位的负超螺旋。
- 中期染色体具有一个蛋白质支架，超螺旋 DNA 的袢环结构结合到这个支架上。

每一条染色体的特征性条带结构来源于去氧核糖核酸蛋白纤维（deoxyribonucleoprotein fibre）的折叠。纤维通过一个蛋白质基质（proteinaceous matrix）组织到一系列的

袢环上。袢环组织形式也适用于细菌拟核(nucleoid)中的情况，尽管其分子基础有些不同。在细菌和真核细胞核中，这种组织特征都可以从对细胞的温和裂解所释放出来的物质特性中被揭示出来。

当大肠杆菌细胞被裂解时，结合在破裂的细胞膜上的纤维状物质以成环的形式被释放出来，如图 6.7 所示。这些环中的 DNA 不是以游离、伸展的双链形式被发现的，而是与蛋白质结合而呈压缩的形式存在。拟核可以通过非常快速的沉淀方式以复合体的形式直接被分离出来，其在质量上含有大约 80%的 DNA。

已揭示出来的一个特征是，分离出的细菌类核 DNA 体现为一种封闭的双链结构，这可以通过它对溴化乙锭(EB)的反应而判断。这种小分子物质在碱基对之间发挥作用，在封闭的环状 DNA 分子中产生了正超螺旋环，也就是说，在两条链中的分子都具有共价整合(covalent integrity)[在开环环状分子中(DNA 的一条链中具有一个切口)或是一个线性 DNA 分子中，DNA 可以任意地旋转以应对小分子的插入，其结果是将引发的张力释放出来]。

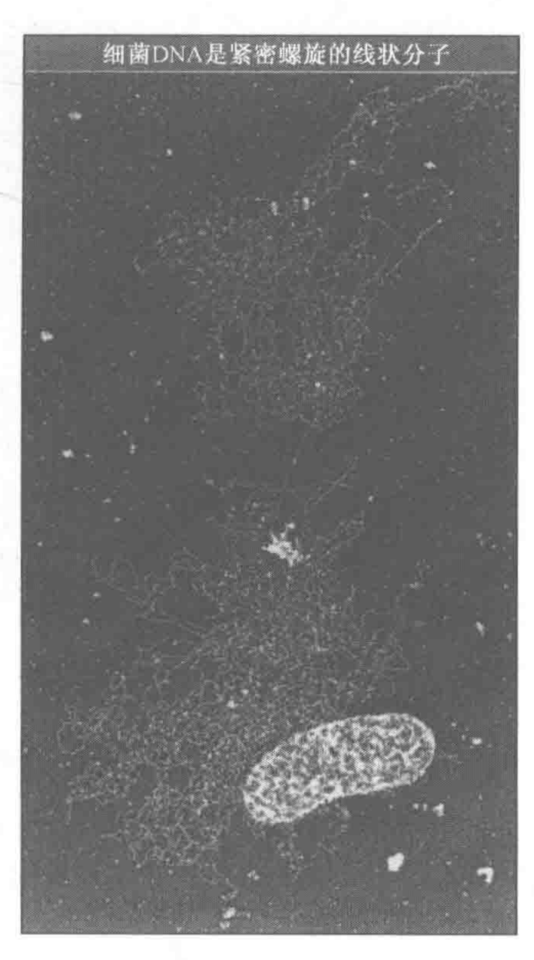


图 6.7 一个裂解的大肠杆菌(*E. coli*)溢出的拟核显示的成环组织的纤维状物质结构。照片由北卡罗来纳大学(Chapel Hill)的 Jack Griffith 惠赠。

当被分离时，压缩的拟核中的 DNA 会产生一些切口；这些切口也可以通过 DNase 的有限度处理而产生。但是这不能解除溴化乙锭产生正超螺旋的能力。在有切口的情况下，基因组保持它对溴化乙锭反应的能力意味着它一定含有许多独立的染色体结构域；在每一个结构域的超螺旋不会受另一个结构域发生的事件的影响。每一个结构域包括了一个 DNA 环，每一个环的末端都以一些(未知的)方式被保护着，它不允许旋转事件从一个结构域传递到另一个结构域。

在一个天然的负超螺旋闭合 DNA 中，溴化乙锭的插入首先移除负超螺旋，然后再增加正超螺旋。达到零超螺旋所需要的溴化乙锭量是对原来负超螺旋密度的一个度量。早先的数据显示每一个结构域包含大约 40kb 的 DNA，但是最近的分析表明结构域可能要小一些，约是 10kb——这与大肠杆菌基因组的大约 400 个结构域相符。结构域的末端并不位于染色体上事先决定的位点，而是随机分布的。

相同类型物理结构域的分割在真核染色体中是一种真实的现象。当细胞核在高浓度蔗糖中裂解后，真核基因组可以作为一个单个紧密的小体被分离出来。当从黑腹果蝇中分离出细胞核时，可以看到它是一个紧实的、盘绕的丝状团块(直径为 10nm)，包含着与蛋白质结合在一起的 DNA。

通过溴化乙锭反应测量超螺旋所得的数据相当于每一个负超螺旋包含大约 200bp

DNA。这些超螺旋可以通过 DNAase 的切割产生切口，虽然 DNA 保持着 10nm 粗细丝状结构形式。这说明超螺旋的引入是通过纤维在空间上的排列实现的，并表现出现有的转矩(torsion)。

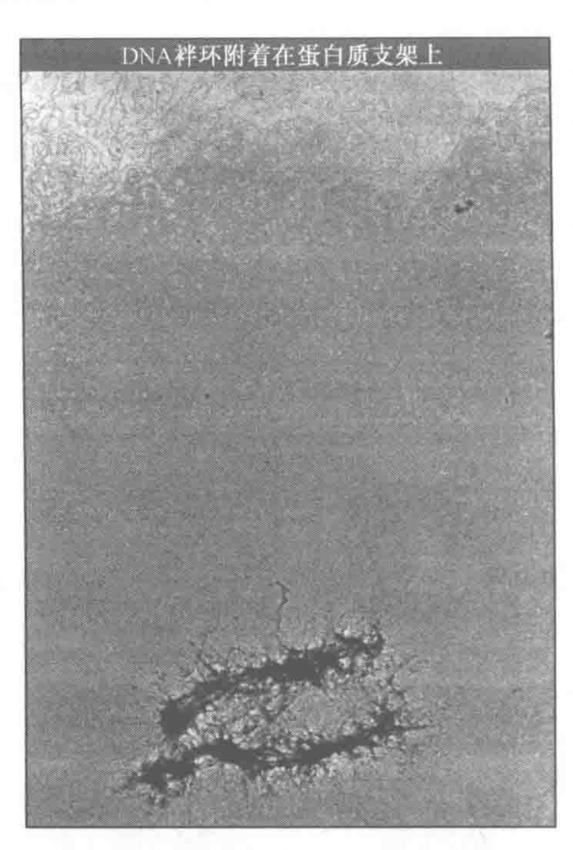


图 6.8　去除组蛋白的染色体包含着一个蛋白质支架，DNA 袢环锚定在支架上。照片由瑞士日内瓦大学的 Ulrick K. Laemmli 惠赠。

超螺旋的完全松开需要在每 85kb 范围内产生一个切口，这可以用于鉴定“闭合(closed)”DNA 的平均长度。这个区域可以包含一个类似于在自然状态的细菌基因组中所鉴定出来的袢环或结构域。当主要的蛋白质从有丝分裂染色体中提取出来后，就可直接看见袢环结构。所获得的复合体包含与约 8% 的原蛋白质成分结合的 DNA。如图 6.8 所示，去除蛋白质的染色体表现为中心支架(scaffold)外围绕着 DNA 晕状结构(a halo of DNA)的形式。

中期染色体支架包括密集的丝状网络。DNA 丝从支架发散出来，表现为平均长度为 10～30μm(30～90kb)的环状结构体系。DNA 可以被消化而不影响支架的完整性——支架中包括一套特殊的蛋白质。这说明了染色体的组织形式——大约 60kb 的 DNA 环状丝锚定在一个中央蛋白质支架上。

在表观上，染色体支架类似于有丝分裂中的一对姐妹染色单体。姐妹支架通常是紧密联结的，但是有时是分离的，只由少数纤维连接在一起。那么这种结构是保持有丝分裂染色体形状的原因吗？它是由于将通常在间期染色质的中保护袢环碱基的蛋白质组分联系在一起而产生的吗？

6.5　特定的序列使 DNA 附着到间期核基质上

关键概念

- DNA 以特定的序列附着在核基质上，这个序列被称为 MAR 或 SAR。
- MAR 富含 A·T，但是没有任何特定的一致序列(consensus sequence)。

DNA 是经由特定的序列被束缚在支架上吗？DNA 在间期细胞核中附着于蛋白质结构上被称为 MAR(matrix attachment region，基质附着区)的位点上。它们有时也被称为 SAR(scaffold attachment region，支架附着区)。在间期细胞中这些位点所结合的结构的本质还不清楚。染色质常常附着在一种基质上，并且已经有很多迹象表明这种附着对于转录或复制是必需的。当细胞核的蛋白质被去除后，DNA 即从一个残留的蛋白质结构中以多环纤维形态伸出来。但是，对在这种试验体系中发现的蛋白质与完整细胞的结构元件之间的联系的探讨还没有成功。

那么，是否有特别的 DNA 区域与基质相连接呢？图 6.9 总结了相关的体内和体外

研究方法。两种方法都开始于通过分离出基质作为包括染色质和核蛋白的粗提物。不同的处理用来确定基质中 DNA 的特性或者鉴定附着于基质上的 DNA。

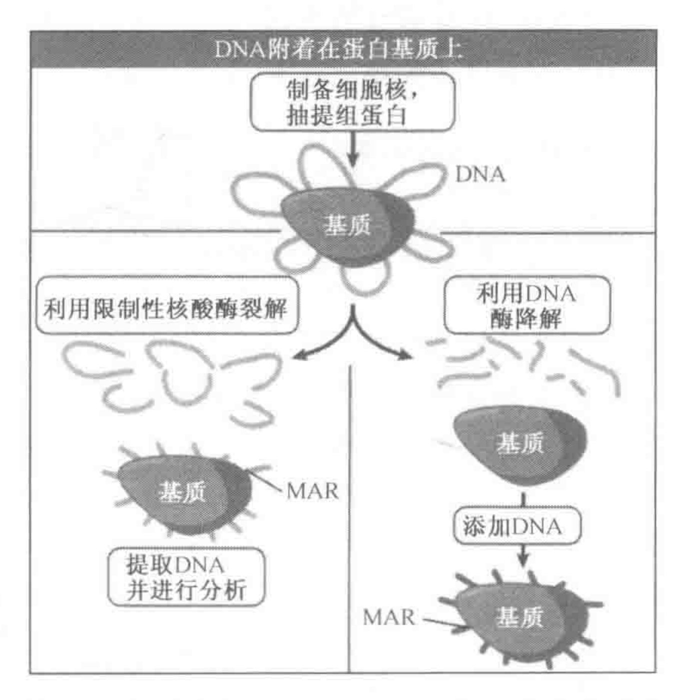


图 6.9 基质结合区域可以通过对保留在体内分离的基质中的 DNA 的定性或者通过对去除所有 DNA 的基质上能结合的片段的鉴别来确定。

为了分析现存的 MAR，染色体的袢环可以通过抽提蛋白质而被解除凝集状态。通过用限制性核酸酶来移除 DNA 环，只留下(推测的)附着在基质上的体内 MAR 序列。

另外有一种替补方法：通过 DNase 处理从基质中移除所有 DNA，然后分离出的 DNA 片段可以用来在体外检测它们结合基质的能力。

在体外或体内都应该有相同的序列与基质联结起来。一旦一个潜在的 MAR 被鉴定出来，在体外所需的最小结合区域的大小就可以通过去除法被确定。随后，我们同样也可以鉴定与 MAR 序列结合的蛋白质。

一个令人吃惊的特征是在 MAR 片段中缺少序列的保守性。它们通常含有约 70% 的 A·T，但是缺少任何一致序列。然而，其他有意思的序列常常处于 DNA 的一段延伸范围内，并包含 MAR。调控转录的顺式作用位点(*cis*-acting site)是普遍的，而且Ⅱ型拓扑异构酶(topoisomerase Ⅱ)的一个识别位点也通常在 MAR 中存在。因此，很可能一个 MAR 具有不只一项功能，不但提供附着于基质的位点，而且包含其他的位点，DNA 的拓扑学变化在这些位点上受到影响。

分裂细胞的染色体支架和间期细胞的基质有什么关系？是相同的 DNA 序列附着在两者的结构上吗？在几种情况中，发现在体内与核基质联系的相同 DNA 片段从中期支架中也可以重新获得；包含 MAR 序列的片段在中期支架中也可以见到。因此，看起来 DNA 包含了单一类型的附着位点，它们在间期细胞中与核基质结合，而在有丝分裂细胞中却与染色体支架连接在一起。

虽然有一些共同的组分，核基质和染色体支架还是包含着不同蛋白质的。Ⅱ型拓扑异构酶是染色体支架的一个显著成分，也是核基质的一个要素，说明在两种情况下拓扑学

控制都是重要的。

6.6 着丝粒对于染色体分离是必需的

关键概念

- 通过微管(microtubule)附着在形成于其着丝粒区的动粒上,真核生物染色体被连接和控制在有丝分裂的纺锤体(spindle)中。
- 着丝粒常常具有异染色质,其中含有丰富的卫星 DNA 序列。

在有丝分裂中,姐妹染色单体移向细胞相反的两极。它们的移动取决于染色体与微管的附着,而微管的另一端则连接在纺锤体极点(微管组成一个细胞的丝状系统,在有丝分裂中重新组织,因而可以将染色体连接到细胞的极点)。在两个微管末端得以组织的两个区域[极区的中心粒(centriole)附近和染色体上]中的位点被称作 MTOC(microtubule organizing centre,微管组织中心)。

图 6.10 显示,有丝分裂中姐妹染色单体的分离发生于有丝分裂经历中期到末期的时间段。染色体上负责使其在有丝分裂和减数分裂中得以分离的区域称为着丝粒(centromere)。每个姐妹染色单体的着丝粒区域被微管向相反的两极牵拉,将与其附着的染色体拖在后边。染色体提供了一个装置,令大量基因附着在有丝分裂装置上完成与细胞分裂伴随的基因分离。其中包括一个位点,在这里单个染色体分离之前其姐妹染色单体被保持在一起。这一区域(着丝粒区——译者注)表现为一个连接一条染色体(两条染色单体)的 4 个染色体臂的缢缩区,如图 6.2 的照片所示——显示了处在有丝分裂中期阶段的姐妹染色单体。

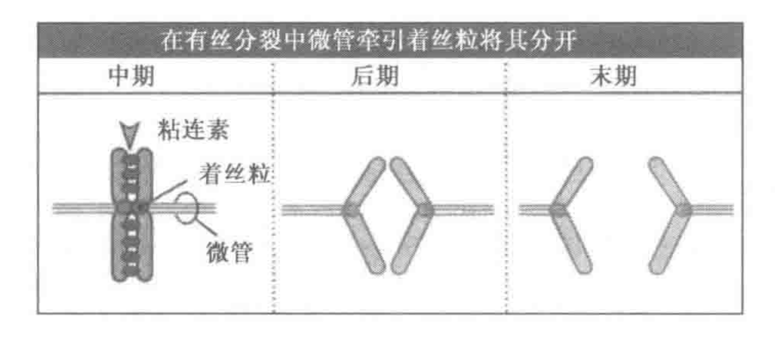


图 6.10 染色体通过附着在着丝粒上的微管被牵拉向两极。一直到后期来到之前,姐妹染色单体都被粘连蛋白(粘连素,cohesin)保持在一起。这里显示着丝粒在染色体的中部(中着丝粒染色体,metacentric chromosome),但它实际上可以存在于沿染色体长轴的任意位置,包括接近末端(近端着丝粒染色体,acrocentric chromosome)和处于末端(telocentric chromosome)。

通过被破坏(断裂)的染色体的行为可以证明,着丝粒对于染色体分离是必不可少的。染色体的单次断裂产生一个保留着丝粒的片段和另一个无着丝粒(acentric fragment)片段。这个无着丝粒片段不会被附着在有丝分裂纺锤体上,结果经过分裂,这个片段不能被包括在任何一个子细胞核中。

包含在着丝粒侧面的染色质区域富含卫星 DNA 序列,并且表现出相当多的异染色

质。因为整个染色体是被浓缩的，所以着丝粒异染色质在有丝分裂染色体中并不十分明显地可分辨。但是，它可以通过一种产生 C 带的显带技术被观察到。在图 6.11 的例子中，所有的着丝粒表现为深度着色区。虽然这是普遍的，但异染色质并不能在每一个已知的着丝粒周围被鉴定，这说明它对于分裂机制可能不是很必要的。

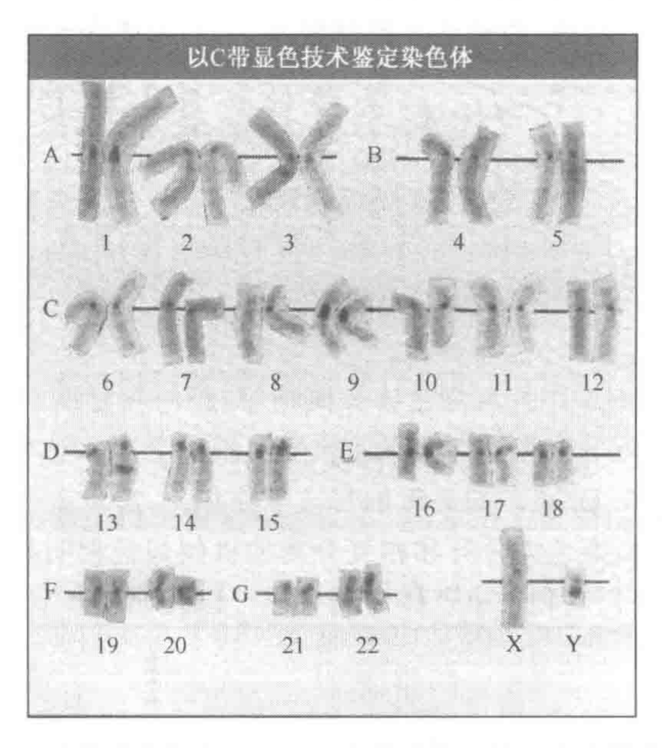


图 6.11　C 带分染技术在所有染色体的着丝粒区产生深度染色。
照片由 Washington 州立大学—Spokane 的 Lisa Shaffer 惠赠。

着丝粒在染色体上形成的区域是通过 DNA 序列确定的(虽然已经被鉴定相关序列的例子还非常少)。着丝粒 DNA 结合在特异的蛋白质上——这些蛋白质承担着建立将染色体与微管附着在一起的结构基础的功能。这种结构被称为动粒(kinetochore)。它是一个深度着色的直径或长度约 400nm 的纤维状结构实体。图 6.12 表明了相应组织层

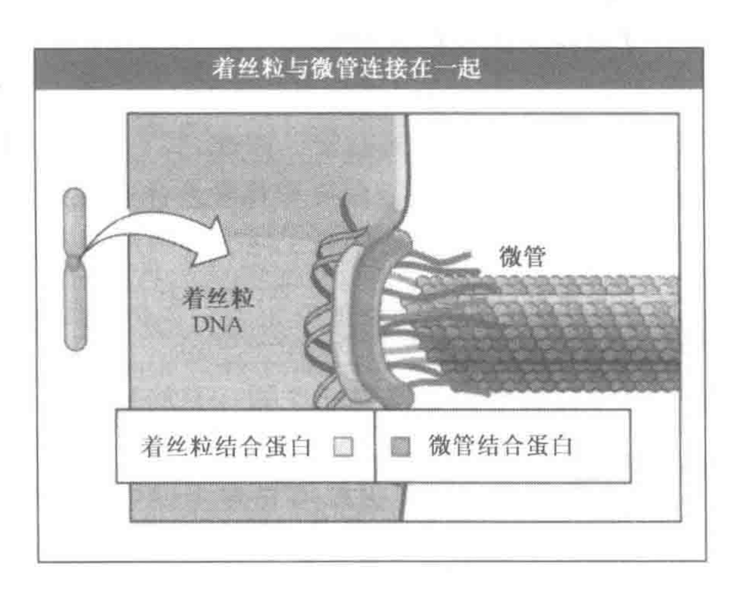


图 6.12　着丝粒通过结合特异蛋白质的一个 DNA 序列而被鉴定。这些蛋白质自己并不结合微管，但是建立了微管结合蛋白按次序结合的位点。

次——将着丝粒 DNA 与微管相连系。结合到着丝粒 DNA 的蛋白质也结合其他蛋白质，而后者又与微管结合在一起(见 6.8 着丝粒结合着一个蛋白质复合体)。

当着丝粒在姐妹染色单体上开始被牵拉到两个相反的极区时，"胶连"蛋白(粘连素，cohesin)则将姐妹染色单体黏着在一起。然后先是姐妹染色单体在它们的着丝粒处分开，随即在(细胞分裂的)后期，当粘连素被降解后，它们彼此完全地松开。

6.7 芽殖酵母(*S. cerevisiae*)的着丝粒具有短 DNA 序列

关键概念

- 在芽殖酵母中，CEN 元件能够使质粒在有丝分裂中精确分离，从而被鉴别。
- CEN 元件含有短的保守序列 CDE-Ⅰ和 CDE-Ⅲ与 A·T 富含区 CDE-Ⅱ。

如果一个着丝粒 DNA 序列和染色体分离相关，任何含有该序列的 DNA 在细胞分裂时都应该准确地移动，而不含有该序列的 DNA 则不能分离。该预测已被用来分离酵母 *S. cerevisiae* 中的着丝粒 DNA。与高级的真核生物相比，酵母染色体的动粒不明显，但在有丝分裂和减数分裂时，染色体分开和相互分离的机制却是相同的。

通过制备具有复制起点和与染色体序列一样可以复制的环状 DNA 可以在酵母中构建质粒。但是，这些质粒在有丝分裂和减数分裂中是不稳定的，主要是因为错误地分离致使它们在大多数细胞中消失。值得说明的是，包含着丝粒的染色体 DNA 片段已经得到分离，它们能够赋予这些质粒有丝分裂的稳定性。

在能够赋予质粒稳定性的序列中，CEN 片段是最短的序列。另一种获得这些序列功能特性的方法就是体外修饰这些序列然后将其再导入酵母细胞内，在细胞内，它们就会代替相关的染色体着丝粒序列。这就使得人们能够根据染色体上信息的前后关系来确定 CEN 功能所需要的序列。

从一条染色体上获得的 CEN 片段可以代替另一条染色体的着丝粒序列而不会造成明显的后果。这一结果显示着丝粒是可以相互交换的。它们可被简单地用来将染色体连接到纺锤体上，但不具有区分两条染色体的功能。

着丝粒功能所需序列的长度大约可以缩小到 120bp 的范围。着丝粒区域包装成一种抗核酸酶的结构，并且它连接一条单独的微管。因此，我们可以通过酵母 *S. cerevisiae* 的着丝粒区域来识别黏合着丝粒 DNA 的蛋白质和将染色体连接到纺锤体上的蛋白质。

如图 6.13 所示，在 CEN 区域中可以区分出 3 种类型的序列元件：

CDE-Ⅰ是一个 9bp 长的序列，该序列非常保守，在所有的着丝粒左边界中变化很小。

CDE-Ⅱ在所有的着丝粒中都有，是长度为 80～90bp、A·T 含有量高于 90%的序列；它的功能更多地取决于序列长度而非精确的序列。它的组成类似一些短的随机重复(卫星)DNA。

CDE-Ⅲ长度为 11bp，在所有着丝粒左边界中是高度保守的。该元件任何一侧的序列保守性相对都要差一些，但对于着丝粒行使功能可能仍然是需要的。

在 CDE-Ⅰ或 CDE-Ⅱ中的突变能够降低着丝粒的功能而不会使其失活，但是在 CDE-Ⅲ中心区 CCG 中的点突变却可以使着丝粒完全失活。

酵母*S.cerevisiae*的着丝粒具有短的保守序列和长的A-T延伸序列

TCACATGATGATATTTGATTTTATTATATTTTTAAAAAAAGTAAAAAATAAAAAGTAGTTTATTTTTAAAAAATAAAATTTAAAATATTTCACAAAATGATTTCCGAA
AGTGTACTACTATAAACTAAAATAATATAAAAATTTTTTTCATTTTTTATTTTTCATCAAATAAAAATTTTTTATTTTAAATTTTATAAAGTGTTTTACTAAAGGCTT

CDE-I *CDE-II* 80-90 bp, >90% A+T *CDE-III*

图 6.13 三种保守区域可以通过酵母的 CEN 元件间的序列同源性被鉴定出来。

6.8 着丝粒结合着一个蛋白质复合体

关键概念

- 在 CDE-Ⅱ区域中形成了一种特异化的蛋白质复合体来代替通常的染色质结构。
- 结合在 CDE-Ⅲ上的 CBF3 蛋白复合体对于着丝粒的功能是必需的。
- 连接着两个复合体的蛋白质可能也提供了与微管的连接点。

我们能够鉴别出对于 CEN 序列的功能所必需的蛋白质吗？有一些基因的突变会影响到染色体分离，其蛋白质定位于着丝粒。图 6.14 总结了这些蛋白质对于维系着丝粒结构的贡献。

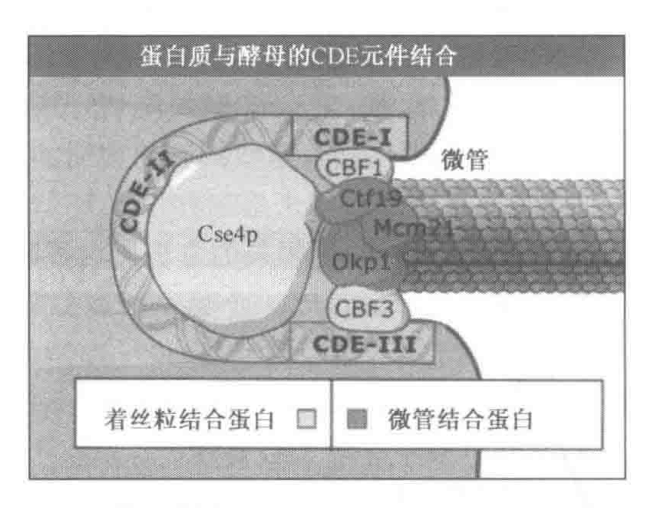


图 6.14 CDE-Ⅱ区域的 DNA 围绕着包括 Cse4p 在内的一个蛋白质聚集体；CDE-Ⅲ与 CBF3 结合，而 CDE-Ⅰ与 CBF1 结合。这些蛋白质被 Ctf19、Mcm21 和 Okp1 组成的一组蛋白质联系着。

有研究者将 CDE-Ⅱ区域结合到 Cse4p 蛋白上构建了一个特殊的染色质结构，这一结构类似于一个组成染色质亚单位的组蛋白（见 6.31 异染色质依赖于与组蛋白的相互作用）。一种叫做 Mif2p 的蛋白质可能也是该复合体的一部分，或者是连接到该复合体上面的分子。在高等真核生物的着丝粒上，Cse4p 和 Mif2p 蛋白具有相对应的成员，分别是 CENP-A 和 CENP-C。这就表明了这一相互作用在着丝粒结构中是一种普遍现象。基本的相互作用包括将 CDE-Ⅱ区域环绕到一个蛋白质聚集体上；很可能在 CDE-Ⅱ区域中一些内在的柔曲性的出现对该反应起到了促进作用。

CDE-Ⅰ区域被一个 CBF1 蛋白同源二聚体所结合。该相互作用对于着丝粒的功能并不是必需的，但是如果该区域不存在，染色体分离的精确度就会下降大约 10 倍。由 4 个蛋白质所组成的、分子质量大约 240kDa 的称为 CBF3 的复合体结合到 CDE-Ⅲ区域上，

该相互作用对于着丝粒的功能是非常重要的。

结合在 CDE-Ⅰ与 CDE-Ⅱ区域的蛋白质彼此相连，并且通过另一个组蛋白（Ctf19、Mcm21 和 Okp1）与结合在 CDE-Ⅱ区域的蛋白质相连。可能着丝粒与微管的连接就是由该复合体的作用实现的。

总体的模型显示，整个复合体通过一个蛋白质结构定位于着丝粒上，类似于一个普通的染色质结构单位（核小体）。在这个结构中，DNA 的弯曲使得蛋白质能够连接到侧面的元件上，成为单个复合体的一部分。该复合体的一些组成成分（可能不是那些直接连接到 DNA 上的成分）将着丝粒连接到微管上。动粒的构建可能在很多种有机体中都因循相似的形式，并且利用了相关的组分。

6.9 着丝粒可能含有重复的 DNA 序列

关键概念

- **高等真核生物染色体的着丝粒含有大量的重复 DNA 序列。**
- **重复 DNA 序列的功能目前还是未知的。**

着丝粒发挥功能所需的 DNA 长度通常是较长的（对于普遍规律来说，*S. cerevisiae* 体内短的离散元件可能是一个特例）。在那些我们能够将特殊的 DNA 序列与着丝粒区域对等看待的情况下，会发现它们通常会含有一些重复序列。这些序列包含一些相当短的、串联重复很多次的 DNA 序列，通常不具有遗传编码的功能。

到目前为止，通过加强质粒稳定性的功能来鉴别着丝粒 DNA 的例子只有 *S. cerevisiae*。然而，在酵母 *S. pombe* 中也用到了一种相关的方法。这种酵母只含有 3 条染色体，并且通过删除每条染色体的大部分区域以形成一个稳定的微型染色体的方法，鉴别出包含每个着丝粒的区域。通过该方法，将着丝粒定位在 40～100bp 的区域内，该区域内含有大量的重复 DNA 序列或者完全是重复 DNA 序列。现在还不清楚，在这些相当长的区域中每个区域在有丝分裂和减数分裂中有多大必要性。

在果蝇的染色体中对着丝粒进行功能定位的尝试显示，它们分散于一个很大的区域，包含 200～600bp 的 DNA 序列。这一类型着丝粒的大尺度表明，它包含有若干与分离的特异功能相关的区域，其中包括动粒组装所需的序列、姐妹染色单体配对所需的序列等。

拟南芥（*Arabidopsis*）体内着丝粒区域的大小也是可以比较的，5 条染色体的每一条都含有一个着丝粒区域，并很大程度地抑制了其中的重组。该区域占有大于 500kb 的 DNA 长度。该区域很明显含有着丝粒，但是没有直接证据告诉我们到底它有多大的必要性。在这些区域中含有一些表达的基因，这就使得我们对该区域是否完全为着丝粒的一部分产生了怀疑。在该区域的中心是一系列 180bp 长度的重复序列，这就是与着丝粒联系的基本结构类型。要说明这些结构与着丝粒功能的相关性如何，目前还为时过早。

组成灵长类着丝粒异染色质的基序（motif）是 α-卫星 DNA，包含 170bp 的串联重复单位。尽管这些重复在着丝粒之间的相关性高于着丝粒内部位于不同区域同家族之间的相关性，单个重复中还是具有明显的差异。很明显，着丝粒功能所需序列位于 α-卫星 DNA 基本模块内部，但是目前还不清楚是 α-卫星 DNA 本身提供了该功能还是包含于 α-阵列内部的其他序列提供了该功能。

6.10 端粒以一种特殊的机制进行复制

关键概念

- 端粒是用来维系染色体末端稳定性的结构。
- 端粒含有一种简单重复序列，其中富含 C+A 的链具有这样的序列：$C_{>1}(A/T)_{1\text{-}4}$。

在所有染色体中存在的另外一种关键结构是端粒(telomere)，它将染色体的末端“封闭”。我们知道端粒一定是一种特殊的结构，因为通过断裂产生的染色体末端是“黏性的”，易于和其他染色体发生相互作用，然而天然的染色体末端却是非常稳定的。

我们可以应用两条标准来识别端粒序列：它一定位于染色体的末端；它一定能赋予线性分子稳定性。

通过研究酵母，人们寻找一个能够提供功能分析系统的问题又发展到了分子水平。所有(由于其具有 ARS 和 CEN 元件)能够在酵母中存活下来的质粒都是环状 DNA 分子。线性的质粒是不稳定的(因为它们通常都被降解了)。我们可以认定端粒是赋予这些质粒稳定性的序列。已被证明位于染色体末端的酵母 DNA 序列，可以通过这种分析来鉴别。一个来自已知的天然线性 DNA 分子(*Tetrahymena* 的附加染色体 rDNA)末端的序列能够反映处于线性状态的酵母质粒的稳定性。

在多种类型的高、低等真核生物中，人们鉴定出了端粒序列的性质。研究者在植物和人体中找到了相同的序列特征，所以端粒的结构建制似乎遵循一种普遍规律。每一个端粒都含有一个长系列的短串联重复序列。它们可能是 100～1000 个重复，重复次数的多少取决于生物的不同。

所有的端粒序列都可以写成一种通用的形式——$C_n(A/T)_m$，其中，$n>1$，$m=1\sim4$。图 6.15 给出了一个普遍的例子。端粒序列一个不寻常的特性就是富含 G-T 链的延伸，通常单链的延伸长度为 14～16 个碱基，G 尾的产生可能是富含 C-A 链有限降解的缘故。

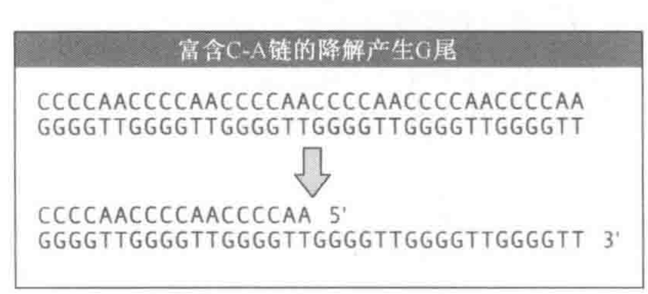


图 6.15 一个典型的端粒是一种简单重复结构，其中富 G-T 链的延伸超越了富含 C-A 链；G 尾的产生可能是富含 C-A 链有限降解的缘故。

端粒以一种特殊的机制复制，端粒酶(telomerase)是一种核糖核蛋白酶(ribonucleoprotein enzyme)。该酶携带有一个模板 RNA，此 RNA 含有于富含 C-A 链相同的序列。该 RNA 模板与端粒中相匹配的区域配对形成引物(primer)，该引物在酶的反转录酶(reverse transcriptase)功能的催化下延伸。酶反应的动力学进程和添加重复的数目由辅助蛋白(ancillary protein)控制。

因为 DNA 复制不能在线形分子的最末端开始，当一个染色体被复制时，端粒中重复序列的数量在减少——这可以通过消除端粒酶的活性来直接证明。图 6.16 表明了如果

端粒酶在一个正在分裂的细胞中突变了，端粒就随着每次细胞分裂而逐渐缩短。图 6.17 显示的就是在酵母中这样一种突变所产生影响的例子，在经历 120 代以上的复制后，端粒的长度由 400bp 开始逐渐缩短，直到完全消失。

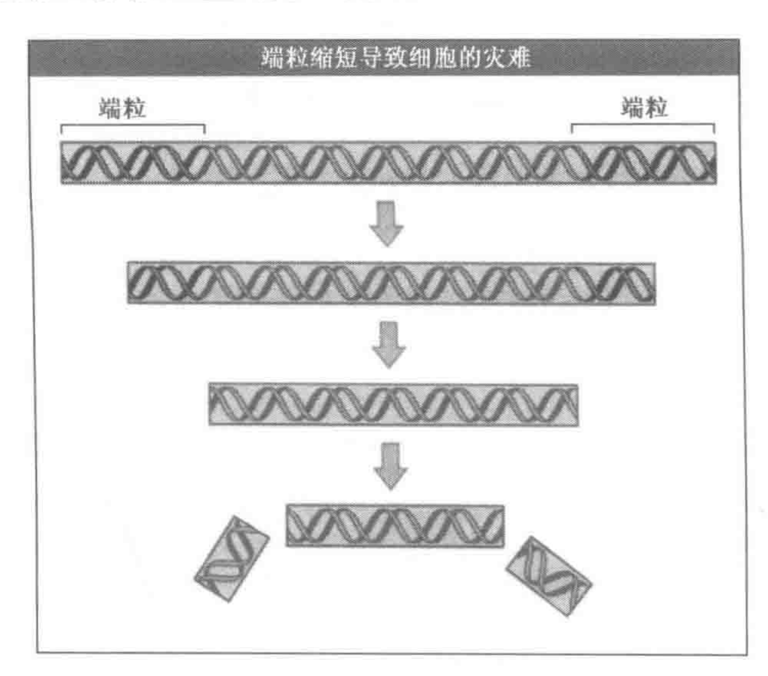


图 6.16　端粒酶的突变导致端粒随着每次细胞分裂而逐渐缩短。最后端粒的消失引起染色体的断裂和重排。

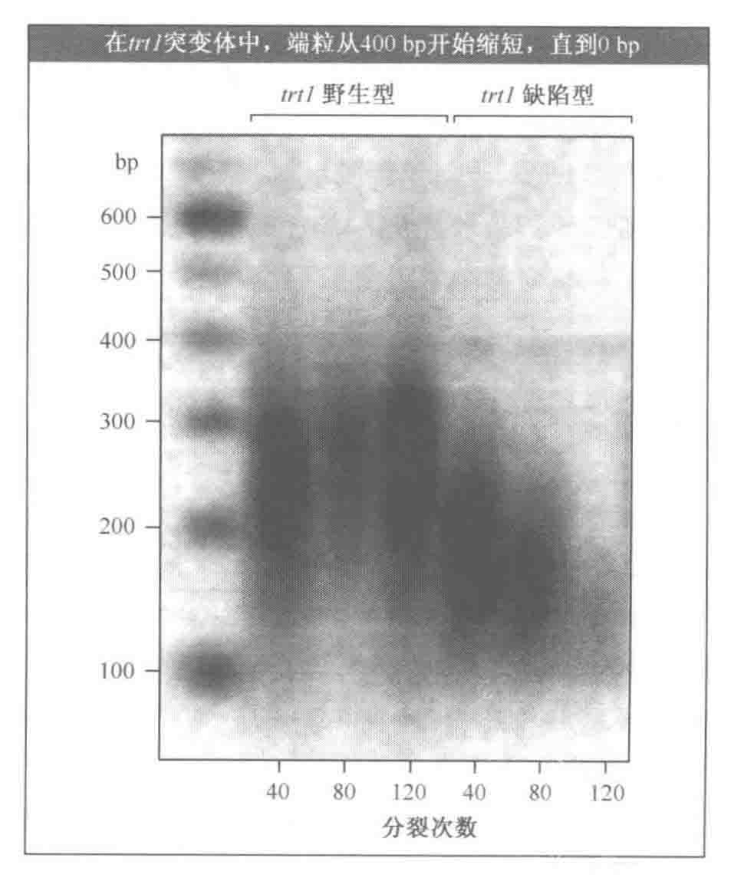


图 6.17　野生型酵母中端粒的长度保持在大约 350bp，但编码端粒中 RNA 成分的 *trt1* 基因的突变很快将端粒长度缩减到 0。照片经 Nakamura 的 T. R. Cech 博士许可复制自 T. M.，et al. 1977. *Science*. 277：955. ©1977 AAAS。

端粒酶通过从头开始在一个端粒上增加重复片段的能力抵消了染色体复制到末端时不能延续到头而引起的重复序列缺失——延伸和缩短处于动态平衡。如果端粒连续不断地被伸长(和缩短),它们的精确序列就可能不相关联了,所需要的就只是使这个末端作为添加序列所需要的一个合适底物被识别了。经过研究,在所有分裂的细胞中都发现了端粒酶的活性,而且在那些不再分裂的终末分化细胞中,端粒酶的活性普遍都被关闭了。

6.11 端粒封闭了染色体末端

关键概念

- TRF2 蛋白催化一个由富含 G 和 T 的链的 3′重复单元在端粒上游区域置换它的同系物而形成一个环的反应。

除了提供了线形 DNA 末端复制问题的解决途径外,端粒也稳定了染色体末端。尽管包含单链 DNA,分离的端粒片段也不发挥正常作用,相反,它们表现出失常的电泳迁移率和其他性质。

图 6.18 显示,在端粒部位形成了一个 DNA 环。任何一个自由末端的缺失就可能是稳定染色体末端的关键特征。在动物细胞中这个环的序列平均长度是 5～10kb。

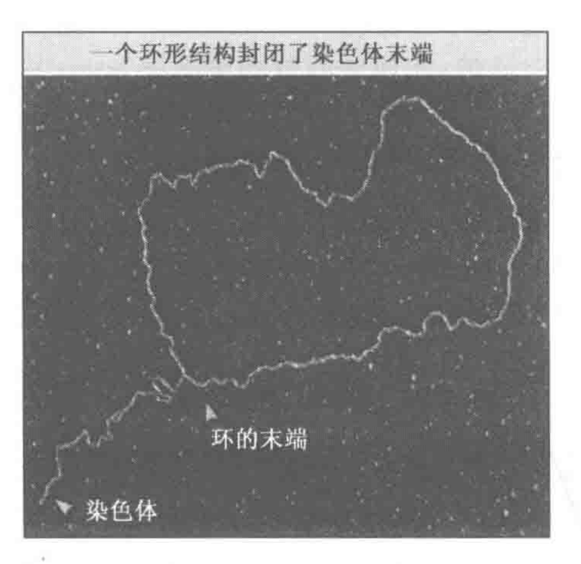


图 6.18　在染色体 DNA 末端部位形成了一个环形结构。照片由北卡罗来纳大学(Chapel Hill)的 Jack Griffith 惠赠。

图 6.19 显示,当 3′端粒的单链末端$(TTAGGG)_n$置换了端粒上游区域的相同区域时,就形成环状结构。这就将双链结构区域转换成了一系列 TTAGGG 重复被置换而形成的单链区域,而且端粒末尾与同源链进行配对。

端粒结合蛋白和其他蛋白质一起形成了一个稳定染色体末端的复合体,而上述反应是被 TRF2 催化的。TRF2 缺失引发染色体重排的事实,证明了 TRF2 蛋白在保护染色体末端方面的重要性。

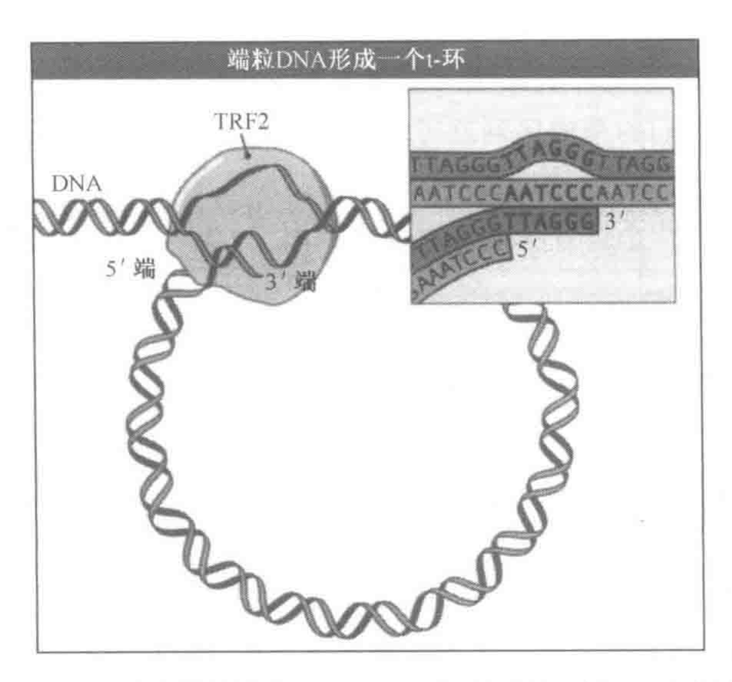


图 6.19 端粒 3′末端单链(TTAGGG)$_n$代替来自双链 DNA 的同源重复序列形成一个环形结构。所涉及的反应受 TRF2 催化。

6.12 灯刷染色体的延长机制

关键概念

- 灯刷染色体的基因表达位点表现出了自染色体轴向外延伸的袢环。

从基因的自然状态看基因表达、看什么样的结构改变与转录相关,是尤为重要的。和辨认其中特殊基因的困难一起,DNA 在染色质中的压缩使人们不可能看见单个活跃基因的转录情况。

在染色体上的单个位点(loci)或位点群(group of loci)因处于高度伸展形式而可以被区分的一些不寻常情况下,基因的表达可以被直接观察到。当许多染色体开始出现明显的结构特征,进入减数分裂阶段时,其结构的侧向分化十分显著。此时染色质结构被称为"染色体"(chromosome)是十分恰当的,其中致密而深染的颗粒(staining granule)成串地连接起来呈念珠状。然而,通常在减数分裂中很少有基因表达,因而用这种材料辨认各个基因的活动状态是不现实的。但是有一种例外情况使得遗传物质的基因表达活性可以被检测——在某些两栖动物中,染色质形成了特征最明显的灯刷染色体(lampbrash chromosome)。

灯刷染色体在一个罕见的、时间延续得很长的减数分裂中形成,这种减数分裂可以持续长达几个月之久!在这个过程中,染色体保持一种可以在光学显微镜下观察到的伸展形式。在减数分裂持续过程中,染色体又恢复到它们通常紧密压缩的大小。可以说延展状态很精致地提供了一个染色体在正常条件下的展开图像。

灯刷染色体是减数分裂二价体,每条染色体都包含了一对姐妹染色单体。图 6.20 显示了一对姐妹染色单体已经大部分分离,仅由交叉(chiasmata)相连的例子。每个姐妹染色单体对都形成了一系列直径大约为 1～2μm、由很细的线状结构连接的椭圆体状染色

粒(chromomere)。这条细线包含了 DNA 的姐妹双链,并且沿着染色体连续延伸,穿过染色粒。

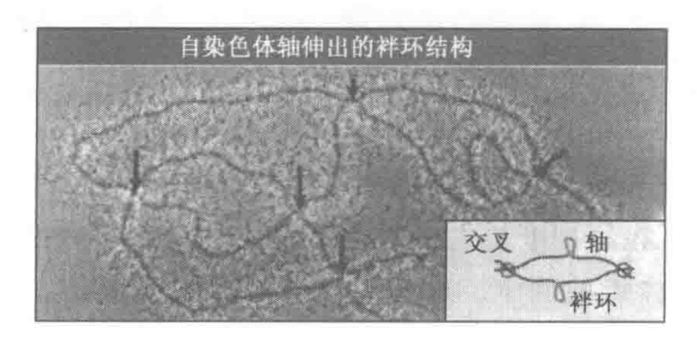


图 6.20　灯刷染色体是减数分裂二价体,每条染色体都包含了一对姐妹染色单体(见箭头所指位置)。照片由 Carnegie 研究所的 Joseph G. Gall 惠赠。

蝾螈(绿红东美螈,*Notophthalmus viridescens*)的单个灯刷染色体长度范围从 400μm 到 800μm,相比之下,在减数分裂后期其长度范围只有 15～20μm。所以灯刷染色体与一般染色体的紧密包装相比舒展了 30 倍。灯刷染色体的全长达到 5～6 mm,装配成了由 5000 个染色粒组成的结构。

灯刷染色体得名于在染色体某些位置上由染色粒伸出的侧向环(它们很像一个灯刷——一种已经消失的用具)。这些环是成对地伸展的,每对中的每一个来自一个姐妹染色单体。这些袢环与染色体的轴线是连续的,这表明了它们代表着染色体中更为紧密的组织延伸出的染色体物质。

这些环由一种核糖核蛋白基质包围,其中包括了新生的 RNA 链。通常一个转录单元的确定依据是沿袢环周围移动的核糖核蛋白的长度增加。图 6.21 就显示了这样一个例子。

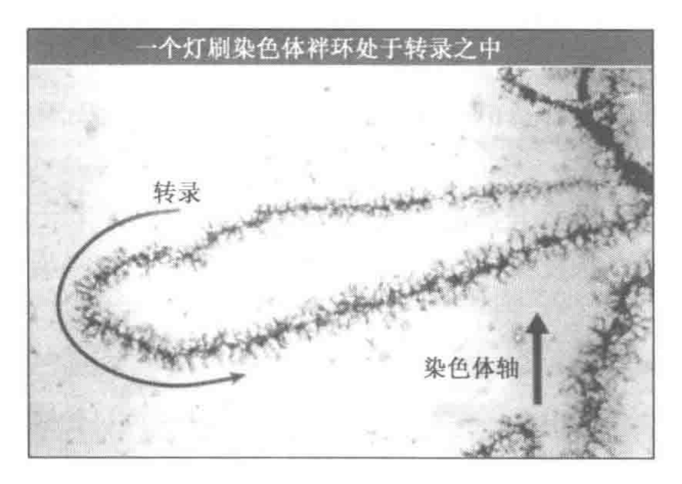


图 6.21　一个灯刷染色体环由一种核糖核蛋白基质包围。照片由 Oscar Miller 惠赠。

可以看出,灯刷染色体上的袢环就是一个正在活跃转录的 DNA 突出片段。在一些情况下,人们鉴定出了与某些特殊基因相对应的袢环。这样,相应基因的属性就可以在原位被详细解读。

6.13 多线染色体形成明暗相间的条带

关键概念

- 双翅目昆虫的多线染色体呈现出一系列的带，它们可以被用作细胞学图谱。

双翅目蝇类幼虫的一些组织的间期细胞核包含了相对于其通常状态增大很多的染色体。实际上，它们的直径和长度都增加了。图 6.22 显示了一个黑腹果蝇(*D. melanogaster*)的唾液腺染色体组的例子。这些染色体被称为多线染色体(polytene chromosome)。

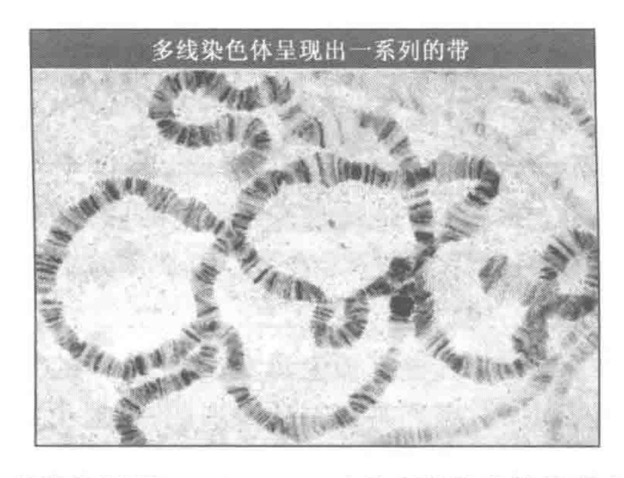


图 6.22　黑腹果蝇(*D. melanogaster*)的多线染色体呈现出一系列明暗相间的带(band)和间带(interband)。照片由 Indiana 大学的 Jesé Bonner 惠赠。

多线染色体组的每一个成员都包含了一系列可见的条带(band)[更恰当的，有时也偶然见到它们被描述为“染色粒”(chromomere)]。条带的大小范围从最宽的 0.5μm 到最窄的 0.05μm(最小的只能在电子显微镜下才可以辨别出来)。这些条带所包含的大部分物质是 DNA，而且可以用合适的试剂染成较深的颜色。这些深染区域之间着色较浅的区域被称为间带(interband)。黑腹果蝇染色体组中大约有 5000 个条带。

果蝇的全部 4 条巨大染色体[原文为“4 条染色体”(four chromosomes)，这不恰当，因为每个粗大的染色体线状复合结构实际上由一对多线化同源染色体紧密配对而形成。这里使用“巨大染色体”作区分，以便读者不至于将其与真正含义的染色体混淆——译者注。]的着丝粒聚集起来形成一个包含有大部分异染色质(在雄性中它还包含了整个 Y 染色体)的染色中心(chromocentre)。考虑到这些，75%的单倍体 DNA 被组织到相间排列的带和间带区域。如果是伸展的形式，DNA 的延伸长度可达 40 000μm。染色体组的长度是 2000μm，几乎比有丝分裂中的单倍体组的长度长 100 倍。这就生动地证实了与间期染色质或有丝分裂染色体通常状态相关的遗传物质伸展范围。

那么，这些巨大染色体所形成的是什么样结构呢？每一条巨大染色体都是由联会的(synapsed)二倍体染色体对经过连续复制产生的。这些复制体(replica)在它们的伸展状态下仍旧是不分离的，仍然相互靠在一起。在这个过程的起始阶段，每个联会的染色体对含有 2C 的 DNA 量(C 代表单个染色体的 DNA 量)。随后，它们就要加倍 9 次，达到其

DNA 含量的最大值 1024 C。在果蝇幼虫的不同组织中，加倍的次数也有所不同。

每个染色体可以被看作大量纵向平行排列的纤维状物体，紧密压缩的区域形成了条带，压缩程度小的区域形成间带。可能每个纤维单位代表一个单倍染色体单位(C)。多线染色体就是由此被命名的。多线的程度就是在巨大染色体里面包含的单倍体染色体的数目。

多线染色体的带型在每个品系的果蝇里都是特有的。条带数目和排列顺序的最早记录是在 20 世纪 30 年代，同时人们还意识到它们形成了染色体的细胞学图谱(cytological map)。包括缺失、倒位和重复在内的染色体结构重排都会引起条带次序的改变。

多线染色体条带的线性阵列可以与基因的线性阵列等同看待。所以在连锁图(linkage map)上看到的遗传学重排(genetic rearrangement)可以联系到细胞学图谱中的结构重组(structural rearrangement)。最终，特定的突变(位点)可以被定位到特定的条带上。由于果蝇中基因的总数目超过了条带的数目，所以大多数或全部的条带中也许有多个基因存在。

特定基因在细胞图谱上的位置可以直接用原位杂交技术来确定。其操作步骤在图 6.23 中加以概述。代表一个基因的放射性标记探针(通常是来自 mRNA 的标记 cDNA 克隆)与多线染色体上变性的 DNA 进行原位杂交。放射自显影技术就通过在条带上叠加起来的显色颗粒显示了相关基因的位置。图 6.24 显示了一个例子。近来，放射性探针

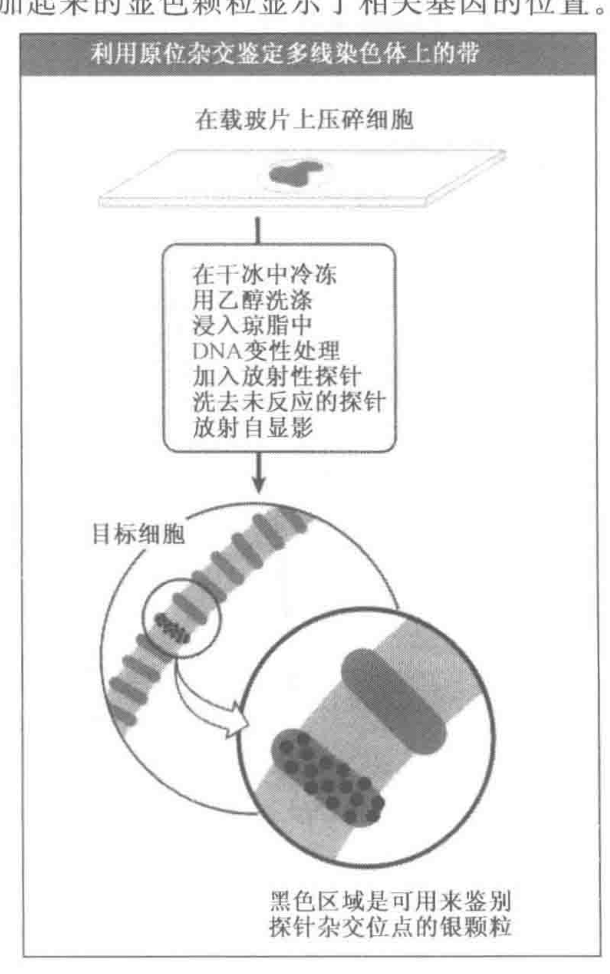


图 6.23 包含特定基因的单个条带可以通过原位杂交来鉴别。

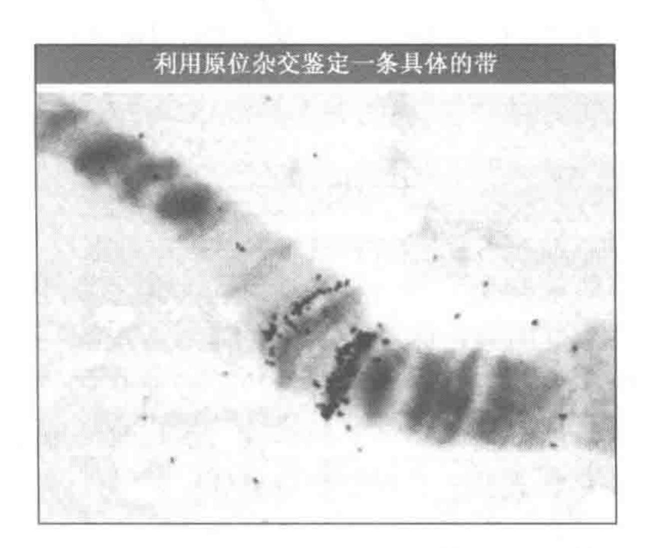


图 6.24 87A 和 87B 带的放大图像，显示用提取自热激细胞的 RNA 标记探针进行原位杂交的结果。照片由 Indiana 大学的 José Bonner 惠赠。

已经被替代为荧光探针。具备了这种技术，就可以直接在条带上确定一段特定序列的存在。

6.14 多线染色体在基因表达的位点形成膨大区域

关键概念

- 多线染色体上基因表达的位点膨胀从而产生“膨泡”(puff)。

多线染色体的一个令人感兴趣的特点是我们可以看见激活的基因位点。染色体上的一些条带过渡性地通过一个扩张状态表现得像一个一个膨泡(puff)的泡状物，这时染色体物质远离中轴而向外突出。图 6.25 显示的是一些大膨泡(称为巴尔比亚尼环，Balbiani ring)的例子。

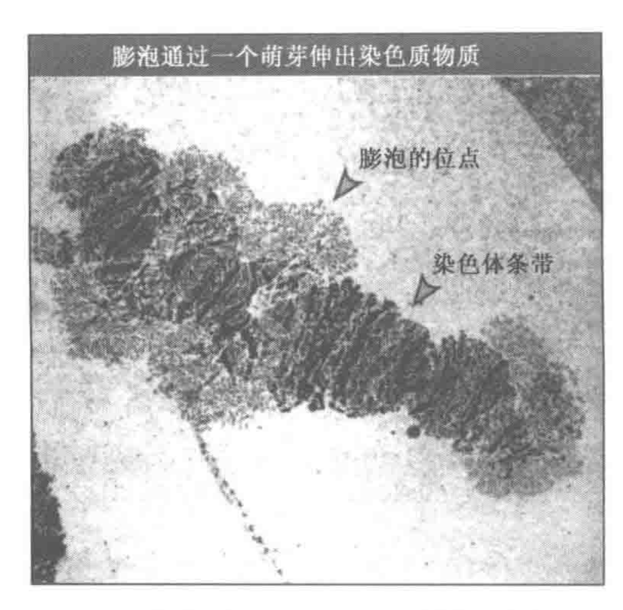


图 6.25 昆虫 *C. tentans* 的唾液腺细胞中第Ⅳ号染色体具有 3 个巴尔比亚尼环。照片复制自 *Cell*, Vol. 4, Daneholt, B. et al., *Transcription in polytene chromosomes*, pp. 1-9。Copyright 1975，获得 Elsevier 许可。照片由 Nobel 医学研究所的 B. Daneholt 惠赠。

那么，膨泡的本质是什么？在膨泡区域里，染色体纤维从它们条带中正常的压缩状态解螺旋。膨泡中的纤维与染色体轴当中的纤维保持连续。膨泡通常发源于单一条带，尽管有时它们特别大——以巴尔比亚尼环为代表。膨泡可以表现得非常弥散，以至于使得下面受其遮掩的条带阵列变得模糊不清。

膨泡的形式与基因表达有关系。在幼虫发育期间，膨泡的产生和消退表现为确定的、组织特异性的形式，而一种特定形式的膨泡被发现在每一种组织的任何时间都存在。控制果蝇发育的蜕皮激素(ecdysone)能够诱导膨泡的产生。一些膨泡由激素直接诱导，而其他的则被早期膨泡产物间接地诱导。

膨泡是正在合成 RNA 的位点所在的区域。普遍接受的观点是，条带的扩张是使结构得以松弛以进行 RNA 合成的结果。因此，膨泡已经被看作是转录的结果，一个膨泡可以由单个激活基因产生。膨泡位点与一般条带的差别在于积累了逐渐增加的蛋白质，包括 RNA 聚合酶Ⅱ和其他转录相关蛋白。

灯刷染色体和多线染色体所展现的特点说明了一个一般结论：为了被转录，遗传物质要从它们通常的紧密压缩状态舒展开来。留在我们脑子里的一个问题是，是否这种表现在染色体总体水平上的结构松解现象模拟了普通真核染色质在有丝分裂间期处于集合状态下分子水平上所发生的事件。

多线染色体的条带是否具有功能上的重要性？或者，每一条带是否代表某种类型的遗传单元？你也许会认为这个答案会从果蝇基因组序列中找到明确的证据，因为通过将间带定位到序列，我们可能阐明是否一个条带有固定的统一形式。然而，迄今为止，还没有发现任何与鉴定条带重要功能有关的带型特征。

6.15 核小体是所有染色质的亚单位

关键概念

- 微球菌核酸酶可以将单个核小体解开成为 11S 的颗粒。
- 一个核小体包含大约 200 bp 的 DNA、两个拷贝的每一种核心组蛋白（H2A、H2B、H3 和 H4）和一个拷贝的组蛋白 H1。
- 核小体的 DNA 包裹在组蛋白八聚体的外表面。

染色质和染色体由脱氧核糖核蛋白构建而来，有好几个组织等级。它最复杂的充分折叠状态可以在有丝分裂的分条带染色体上看到。它的基本亚基在真核生物中是相同的：一个核小体包含约 200bp 的 DNA 和若干种组蛋白，而非组蛋白则负责将线状排列的核小体串折叠成更高组织等级的纤维。

当间期核悬浮在低离子强度的溶液中时，它们将膨胀、破裂，并释放出染色质纤维。图 6.26 显示了裂解的核，其中有染色质纤维溢出。在一些区域有密集的纤维堆积成的物质，但在一些扩展的区域能够看到其中的物质由一些离散的颗粒组成，这些颗粒就是核小体。在特别延展的区域，单个的核小体由一根细纤维连接起来，这根细纤维就是游离的



图 6.26 染色质从包含紧密组织的成串颗粒的细胞核的裂解物中溢出。照片由 France 学院的 Pierre Chambon 惠赠。照片复制自 *Cell*, vol. 4, Oudet, P., et al., Electron microscopic and biomedical evidence …, pp. 288-300. Copyright© 1975，获得 Elsevier 许可。

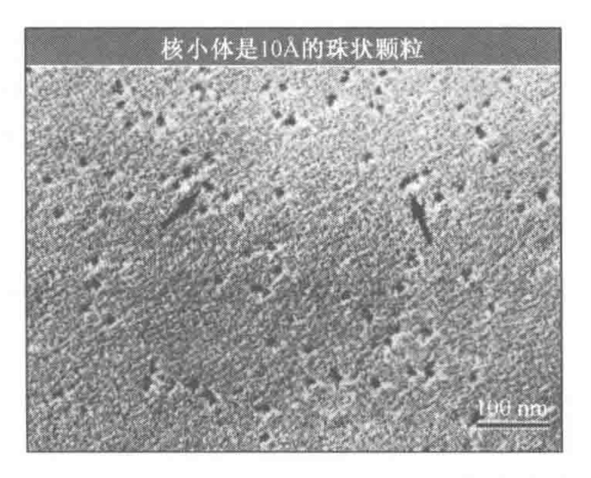


图 6.27 单个核小体通过裂解微球菌核酸酶消化染色质而释放出来。照片由 France 学院的 Pierre Chambon 惠赠。照片复制自 *Cell*, vol. 4, Oudet, P., et al., Electron microscopic and biomedical evidence …, pp. 288-300. Copyright© 1975，获得 Elsevier 许可。

DNA 双链——连续的 DNA 双链纤丝贯穿着一系列颗粒。

用**微球菌核酸酶(micrococcal nuclease)**处理染色质就可以得到单个核小体。核酸酶在核小体的连接处切割 DNA 链。起初，它释放出很多微粒团；最后，释放出单个核小体。在图 6.27 中可以看到致密颗粒状的单个核小体，其沉降系数约为 11S。

核小体包括和组蛋白八聚体结合的约 200bp 的 DNA，其中八聚体分别含有两个拷贝的 H2A、H2B、H3 和 H4 组蛋白。它们的结合模式见图 6.28。这个模型解释了染色质中核心组蛋白按化学计量的组成情况：H2A、H2B、H3 和 H4 的摩尔含量相同，每 200bp 的 DNA 分别含有其中每种蛋白质的两个分子。

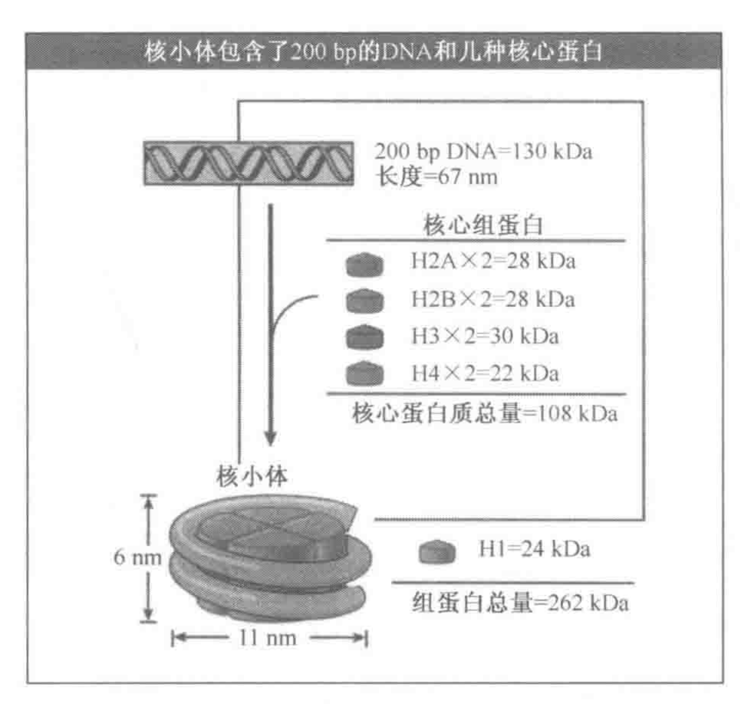


图 6.28　核小体包含将近等质量的 DNA 和组蛋白(包括 H1)。一个完整核小体的预期质量是 262 kDa。

组蛋白 H3 和 H4 是已知最保守的蛋白质，这说明它们的功能在所有真核生物中是一致的。H2A 和 H2B 的类型可以在真核生物中找到，但是它们的序列表现出比较明显的物种特异性。

组蛋白 H1 包括一组紧密相关的蛋白质，它们在组织和物种之间有比较明显的变异(并且在酵母中不存在)。H1 的功能和核心组蛋白不同。它的含量是一种核心组蛋白的一半，能比较容易地从染色质中抽提出来[典型的方法是用稀盐溶液(0.5mol/L)]。组蛋白 H1 可以被移除而不影响核小体的结构，这说明它的位置在核小体核心颗粒之外。

核小体的形状相当于一个扁平圆盘或一个圆柱体，直径为 11nm，高为 6nm。DNA 长度大约是 34nm 的颗粒圆周的两倍，DNA 对称地围绕着组蛋白八聚体。图 6.29 显示 DNA 路径沿着圆柱形八聚体呈螺旋状围绕了两圈。注意 DNA 在“进入”和“离开”核小体的地方靠得很近，组蛋白 H1 可能就位于这个区域(见 6.17 核小体拥有一个共同的结构基础)。

对于这个模型，我们通过核小体的纵切面来观察。在图 6.30 中我们看到，DNA 环绕成的两个圆周靠得很近。圆柱的高度为 6nm，其中 4nm 被两圈 DNA(直径各 2 nm)所占据。

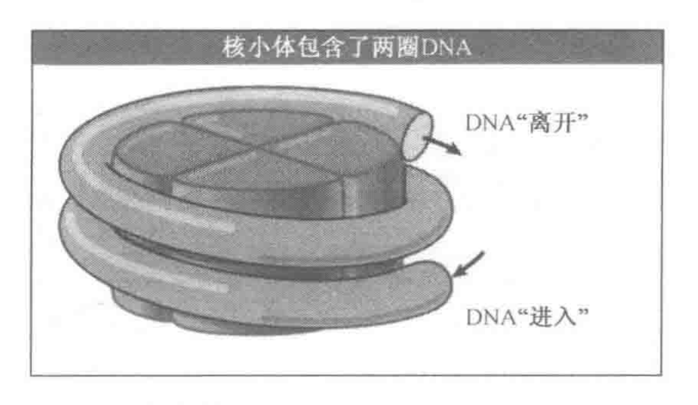


图 6.29　核小体可能是柱状结构，DNA 在其表面上组装成两圈螺旋。

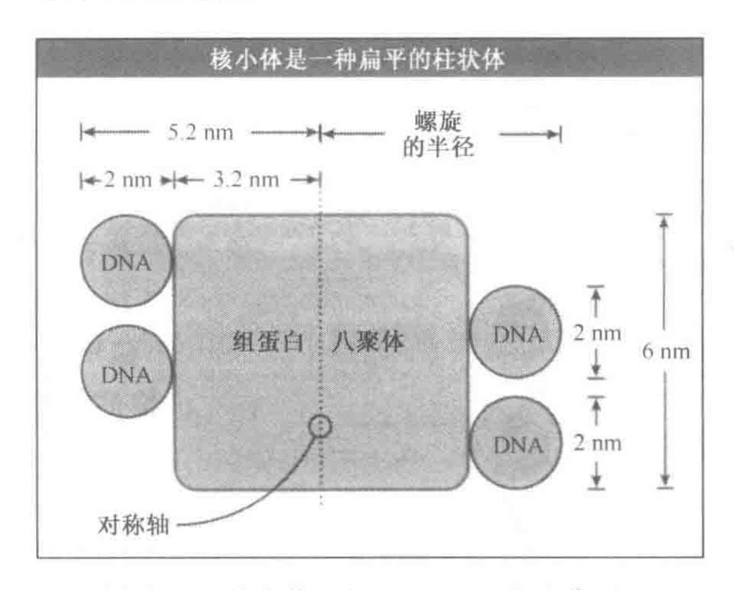


图 6.30　核小体上的两圈 DNA 相互靠近。

两圈 DNA 的格局可能有功能上的相关性。因为绕核小体一圈的 DNA 长约 80bp，自由双螺旋 DNA 中相隔 80bp 的两点，在核小体表面上实际上可能靠得很近，见图 6.31。

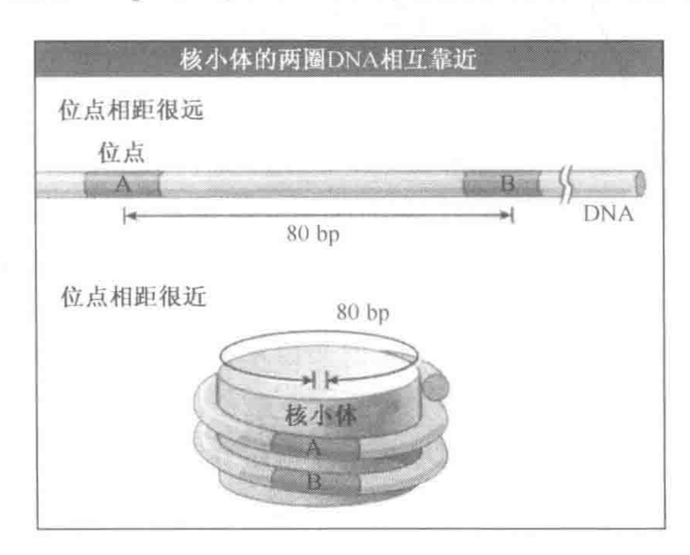


图 6.31　盘绕在核小体上不同圈上的 DNA 序列可能相互紧密靠近。

6.16 DNA 盘绕在核小体阵列上

关键概念

- 当用微球菌核酸酶切割染色质时，大于 95%的 DNA 能够在核小体或多聚核小体串当中被回收。
- 每个核小体上 DNA 的长度在不同组织中有 154～260bp 的变化范围。

当染色质用微球菌核酸酶消化时，DNA 被切割成完整的单位长度片段的倍数大小。片段经过凝胶电泳后产生阶梯状的带谱(见图 6.32)。这种梯状图谱共有 10 步(对应于酶切步骤，步骤多意味着酶切片段小——译者注。)扩展，经测定，连续两步之间的间隔大小约为 200bp。

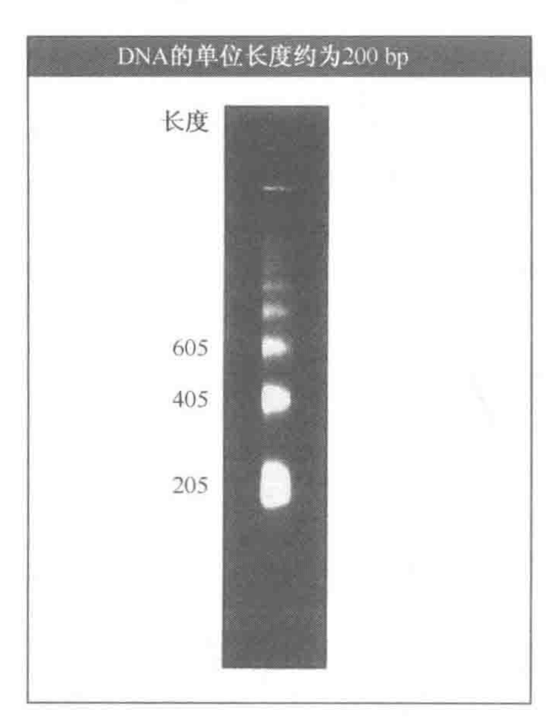


图 6.32 微球菌核酸酶消化细胞核中的染色质成为多个单位长度 DNA 的系列成分，可以被凝胶电泳分离成系列条带。照片由 Universität Zürich 的 Markus Noll 惠赠。

图 6.33 表明梯状 DNA 电泳条带是由一组一组多核小体单位形成的。当用蔗糖梯度分离这些核小体时，它们就会产生一系列不连续的峰，分别代表单体、二聚体、三聚体等。当这些 DNA 从各自的组分中提取并电泳时，每一部分会产生一个 DNA 条带，条带大小和核酸酶切的图谱上相应的一步一致。单体单位的核小体包含单位长度的 DNA，核小体的二聚体含有二倍单位长度的 DNA，以此类推。

因此，梯状图谱的每一个条带都代表来源于一定数目的核小体多聚体的 DNA。因为对于任何染色质，都存在相应的 200bp 单位的梯状酶切片段电泳图谱，所以，可以表明 DNA 是被组织在核小体结构单元中的。在微球菌核酸酶作用下产生梯状酶切图谱时，细胞核中仅有 2%的 DNA 呈现酸溶性(降解成了小片段)。因此，一小部分 DNA 被微球菌核酸酶特异地切割了，它们一定代表了特异的敏感区。

当染色质从细胞核内溢出时，我们经常看见由一根游离的 DNA 细丝连接的一系列核小体(念珠模型，the beads on a string)。然而，体内状况下对 DNA 紧密压缩的需求表明，可能极少或不存在游离的 DNA。

大于 95%的染色质 DNA 可以从以 200bp 为单位的梯状酶解产物中回收，这个事实证实了以上观点。所以，几乎所有 DNA 都要被组织在核小体结构中。在自然状态下，核小体可能被紧密地装配，DNA 从一个核小体直接贯穿到下一个。游离 DNA 可能是在 DNA 分离过程中由于某些组蛋白八聚体的丢失而产生的。

存在于核小体中的 DNA 的长度会和典型的 200bp 有所不同。任何具体细胞类型的染色质都会有一个特有的平均长度(±5bp)。最常见的总体平均长度在 180～200 bp 变动，但也有极端情况——可以短到 154bp(一种真菌)，还可以长到 260 bp(一种海胆的精

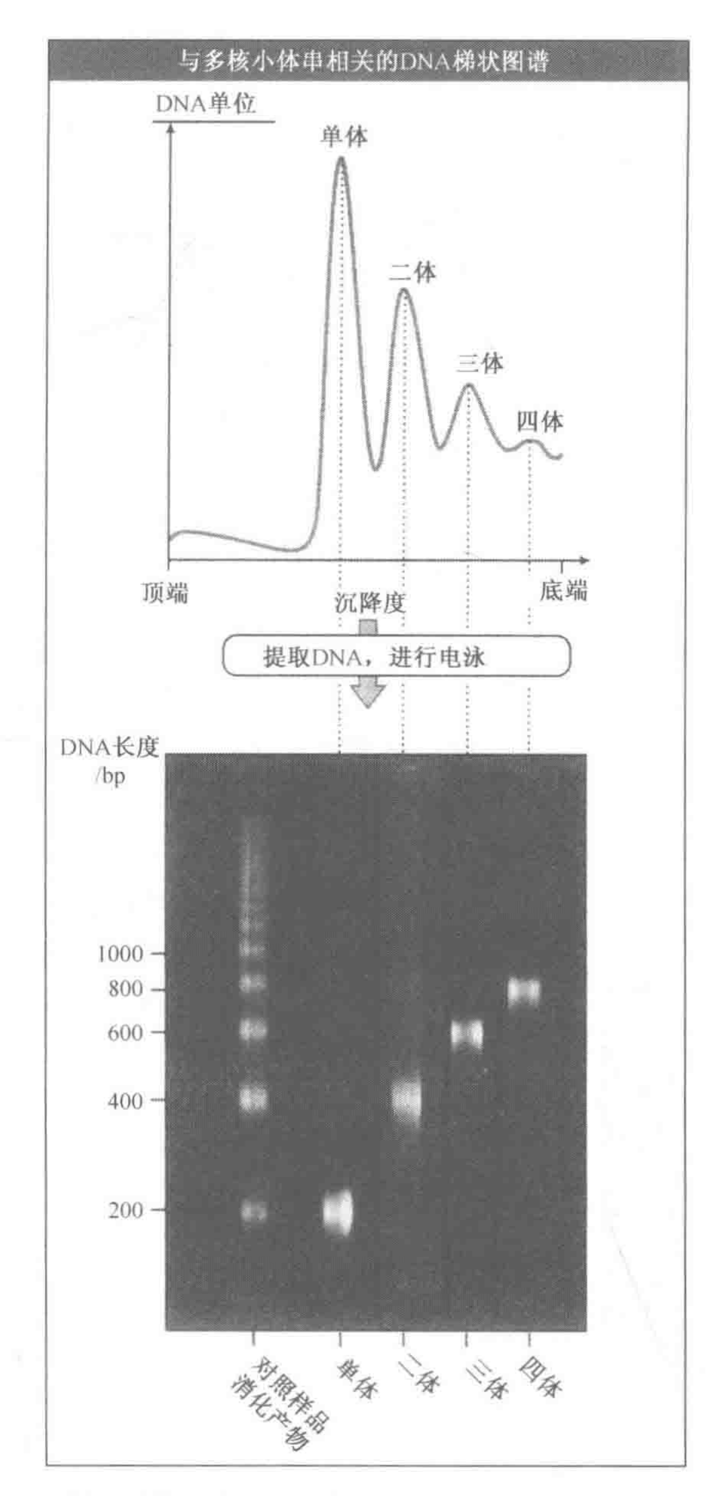


图 6.33　每个多核小体串包含了适当数目的单位长度 DNA。照片由 MRC 分子生物学实验室的 John Finch 惠赠。

子)。在成体生物不同组织中的平均数可能不同,在同一个细胞类型基因组中的不同部分也会有不同。造成偏离基因组中平均值的情况可能包括串联重复序列,例如 5S RNA 基因簇。

6.17 核小体拥有一个共同的结构基础

关键概念

- 按照对微球菌核酸酶的敏感性，核小体 DNA 分为核心 DNA 和连接 DNA。
- 用微球菌核酸酶进行延长时间的消化，发现在核小体核心微粒上的核心 DNA 是长度 146bp 的片段。
- 连接 DNA 是 8～114bp 的区域，对酶的早期切割敏感。
- 连接 DNA 长度的变化决定了核小体 DNA 总长度的变化。
- 组蛋白 H1 和连接 DNA 结合，可能位于 DNA"进入"和"离开"核小体的位置。

不同来源的核小体所含有的不同数量的 DNA 建立在共同的结构基础上。DNA 和组蛋白八聚体结合形成的核心颗粒包含 146bp 的 DNA，不管核小体中 DNA 的总长度是多少；每个核小体上 DNA 总长度的变异是在这个基础核心结构上产生的。

核心颗粒是用微球菌核酸酶在单体核小体上作用的效果来确定的。酶的初始反应是在核小体之间进行切割，但是如果单体已经得到之后还允许酶继续反应下去，那么它就会继续消化每个核小体的 DNA。这就会发生一种反应——DNA 从核小体的末端被"修剪"。

在不连续的酶切步骤中，DNA 长度减小，如图 6.34。以大鼠肝细胞核为例，起初核小体单体有 205bp 的 DNA；随后，一些单体核小体的 DNA 即缩短到了 165bp；最后，DNA 长度缩短到了核心颗粒 DNA 的长度——146bp[核心颗粒相当稳定，但是持续的酶解产生了一个极限消化(limit digest)其中，最长的片段为 146bp，而最短的只有 20bp]。

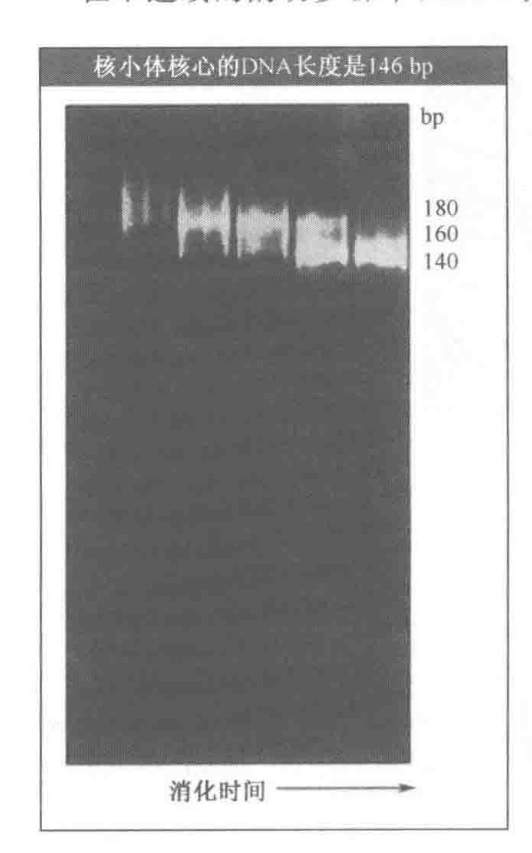


图 6.34 微球菌核酸酶在酶解的不同步骤减小了核小体单体上 DNA 的长度。照片由 Stanford 大学的 Roger Kornberg 惠赠。

这个分析表明核小体 DNA 可以分为两个区段：

- 一是核心 DNA，它含有 146bp 的恒定长度，并表现出对核酸酶的相对稳定性；
- 二是连接 DNA，它包括剩余的重复单元部分。在每一个核小体中它的长度变化在少至 8bp 到多至 114bp 之间。

由微球菌核酸酶进行初始切割产生的精确大小的 DNA 条带表明，对酶的直接作用敏感的区域是受限制的。它只代表了每一个连接 DNA 的一部分(如果全部连接 DNA 都是敏感的话，这条带的大小将从 146bp 变化到大于 200bp)。但是在连接 DNA 上一旦产生切割，剩下的区域就变得敏感了，进而可以被进一步的酶切作用较快地移除。图 6.35 显示了核小体间的连接。

核心部分含有与核小体自身相似的性质，尽管

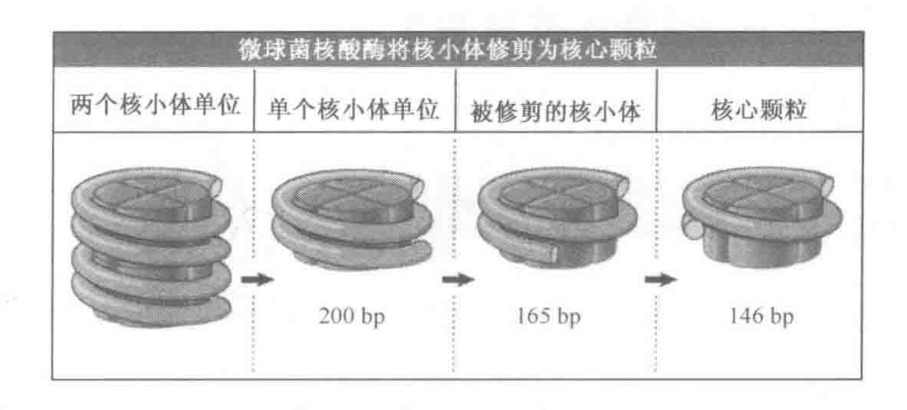


图 6.35 微球菌核酸酶起初在核小体之间进行裂解。单体的核小体典型的 DNA 大小是约 200 bp。末端修剪首先将 DNA 长度减少为大约 165 bp,然后产生包含长度为 146 bp DNA 的核心颗粒。

它们较小一些。它们的形状和大小都与核小体相似,这表明核小体颗粒的主要几何形状是由核心区域的 DNA 和蛋白八聚体之间相互作用建立起来的。因为核心组分可以作为均一组分而比较容易地获得,它们经常优先于核小体而被用于结构方面的研究(核小体的研究体系变化较多,因为其没有进行末端修剪的 DNA 制备物比较难以获得)。

核心区域和连接区域的物理学本质是什么?这两个术语的确定是一种“操作定义”,描述了不同区域对核酸酶处理的相对敏感度的差异。这个描述并没有对它们的确切结构作任何暗示,然而,它表明核心 DNA 的主要部分是紧密地缠绕在核小体上的,尽管核心 DNA 的末端区域和连接区域都是伸展的(见 6.18 在核小体表面 DNA 的结构变化多端)。

连接 DNA 的存在依赖于 4 个核心组蛋白以外的因素。体外重组实验显示,组蛋白具有把 DNA 组织到核心部分的内在能力,但是它并不能形成具有正确单位长度的核小体。DNA 超螺旋的程度是一个重要因素。在天然的一系列核小体结构中,组蛋白 H1 和(或)非组蛋白影响了与组蛋白八聚体相连的连接 DNA 的长度。并不是核小体组成部分的“装配蛋白(assembly protein)”在体内实验中参与了组蛋白与 DNA 装配成核小体的过程(见 6.21 染色质的再生需要核小体的组装)。

组蛋白 H1 位于什么地方?在核小体单体降解时,组蛋白 H1 就会消失。它可以存在于依旧含有 165bpDNA 的单体上,但是在 DNA 最终减少到 146bp 的核心部分上就一定消失了。这就表明组蛋白 H1 很可能位于最靠近核心 DNA 的连接 DNA 区域。

如果组蛋白 H1 位于连接 DNA 上,它就有可能通过结合在核酸“进入”和“离开”的位点而将 DNA“封”在核小体上(见图 6.29)。H1 位于邻近核小体的连接区域的看法与以往的研究结果是一致的:H1 能比较容易地从染色质上去除,而不含 H1 的染色质更容易“溶解”。而且,当 H1 已经移除时,就比较容易获得一个在染色质丝上含有延伸态纤丝的念珠状结构。

6.18 在核小体表面DNA的结构变化多端

关键概念

- DNA 绕组蛋白八聚体 1.65 圈；
- DNA 的结构发生了改变，所以它在中部区域含有增加的碱基对/圈，在末端含有减少的碱基对；
- DNA 的大约 0.6 个负圈被吸收，使得在溶液中的 10.5 圈改变成核小体表面的 10.2 圈，这就解释了连接数目的自相矛盾。

DNA 在核小体表面的暴露本身就能解释了为什么它容易被特定的核酸酶所裂解。核酸酶对单链 DNA 的酶切反应已经有资料能够特别地进行说明了。这些酶(例如 DNA 酶Ⅰ)在 DNA 上形成单链切口。它们裂解一条链上的键，而另外一条链在该位点保持完整，所以在双链 DNA 上看不到可见的效果。但是通过变性，短片段被释放出来，而全长的单链不被释放。如果在 DNA 末端加以标记，末端片段就可以在放射自显影技术下进行识别，见图 6.36。

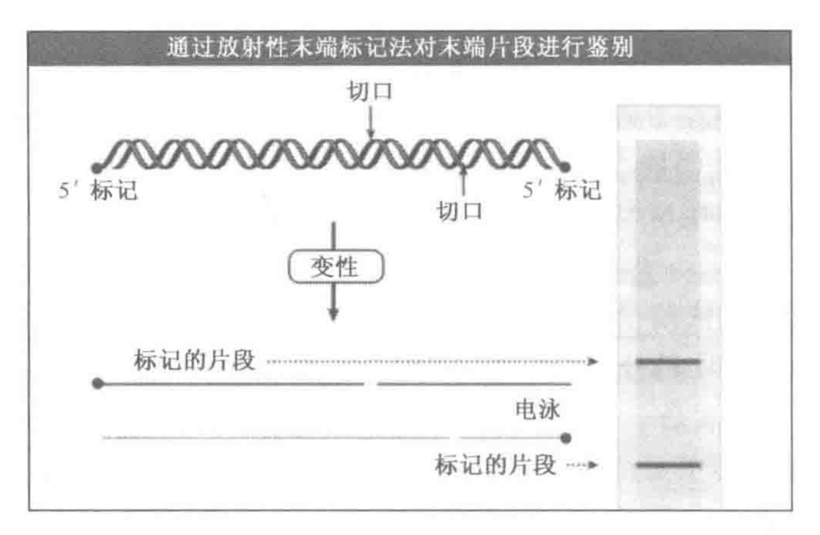


图 6.36 当 DNA 变性产生单链时，双链 DNA 中的切口就被所出现的片段所揭示。DNA 在一个末端(如 5′段)标记，则只有这一端能够通过放射自显影技术观察到。片段大小可用来确定切口与标记末端的距离。

当 DNA 在溶液中处于游离状态时，它可以相对地被随机断裂产生切口。核小体上的 DNA 也可以被酶所切割，但是它只能发生在特定的间隔处。当切割位点通过 DNA 末端标记，以放射自显影方法确定时，在随后对 DNA 进行变性和电泳分离后，就会获得图 6.37 所展示的分类梯状条带图谱。

在梯状条带图谱之中，相邻条带之间的间隔是 10～11 个碱基对。条带图谱延续的距离是核心 DNA 的全长。裂解位点用 S1 到 S13 计数(这里的 S1 表示的是距离标记的 5′端 10 个碱基对的位置，S2 表示的是距离 20 个碱基对的位置，依此类推)。

并不是所有的位点都具有相同的切割效率：一些位点的切割非常有效，而另一些位点则几乎不被切割。尽管在条带强度上有一些不同，DNA 酶Ⅰ和 DNA 酶Ⅱ产生的条带阶

梯却是相同的，这表明切割样式代表了在 DNA 中的唯一的系列靶点，这取决于其组织形式，只是特定的酶促使反应对特殊位点略有一些偏好。通过一个羟基基团的切割也可以产生相同的切割样式，这表明切割样式显示的是 DNA 自己的结构，而不是任何序列的有限选择。在特定目标位点的反应缺乏起因于核小体的结构，其中在 DNA 上的某些位置不容易被接近。

因为核心颗粒的 DNA 含有两条链，在一个末端标记实验中，两个 5′(或者 3′)端(每条链上都有一个)都被标记。所以切割的样式包括了来源于两条链的片段。这种现象可以从图 6.36 中看出，每一个标记的片段来源于一条不同的链。必然的结果是，在一个实验中，每一条标记条带事实上代表了两个片段，它来源于对两条链的任何一个标记末端相同距离的切割。

图 6.37　沿着核心 DNA 产生的切口具有有规律的间隔距离，正如图中核 DNA 的 DNase Ⅰ 消化结果。照片由 Henry Ford 医院的 Leonard Lutter 惠赠。

在这些特殊位点的离散性偏好选择有什么重要意义呢？一种观点认为，在颗粒上 DNA 的路径是对称的(大体有一个水平轴线通过核小体，如图 6.29)。所以如果(例如)通过 DNA 酶 Ⅰ 切割没有产生 80 碱基的片段，这就必然意味着在任何一条链上距离 5′端 80 个碱基的位置对酶并不敏感。

当 DNA 在平坦表面固定不动时，其位点就可以常规的实验体系被切割。图 6.38 显示，这反映了随 B 型 DNA(由 Watson 和 Crick 发现的经典 DNA 双螺旋模型)螺旋周期的暴露位点的重现性。切割周期(切割位点之间的距离)与结构周期(双螺旋每一圈的碱基数)相符，或者更确切地说切割周期是结构周期的反映。所以位点之间的距离与每一圈的碱基对数相符。对这一类型反应的衡量显示，B 型 DNA 双螺旋的单位平均碱基对数是每一圈 10.5bp。

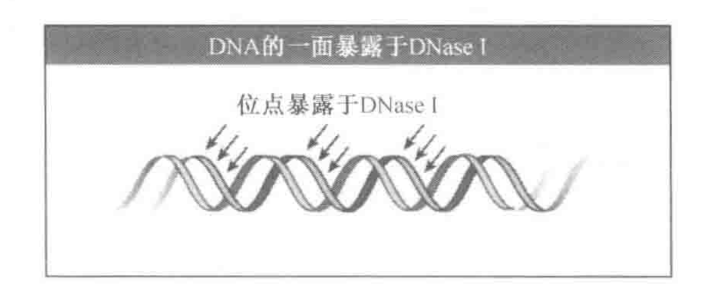


图 6.38　DNA 上最暴露的位置周期性地重现，反映了双螺旋 DNA 的结构特性(为了明确起见，只在一条链上标出了所涉及的位点)。

核小体上目标位点的本质是什么？图 6.39 显示每一个位点上有 3～4 处发生切割，也就是说，每个切割位点的限定范围是±2bp。一个切割位点代表了两条链上的化学键上的短小延伸，暴露于跨度为 3～4 个碱基对的酶促反应。相对的反应强度显示某一些位

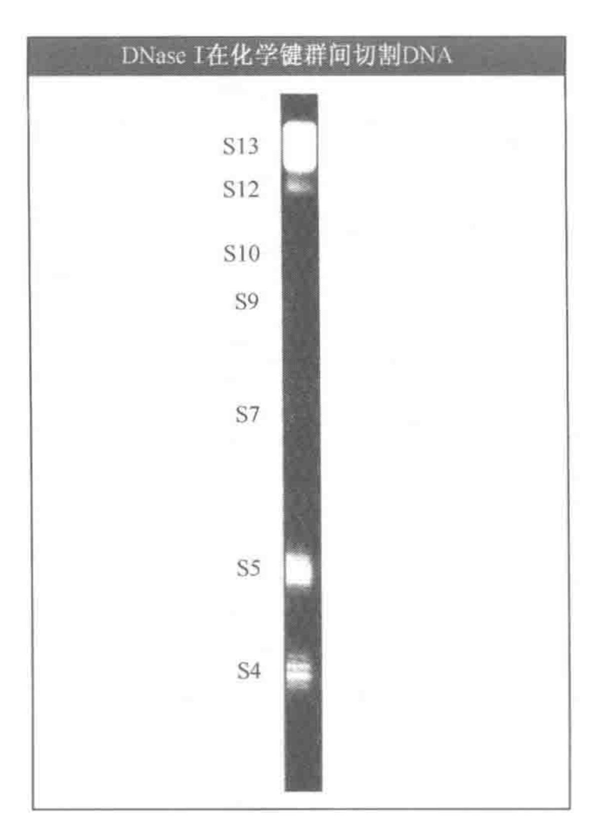


图 6.39 高分辨率分析表明，DNase Ⅰ的每一个切点包含了若干个相邻的、敏感的磷酸二酯键，正如此例所示。实验通过对核心 DNA 的末端标记对 S4 和 S5 位点进行了分析。照片由 Henry Ford 医院的 Leonard Lutter 惠赠。

点要比另一些位点更受酶的偏好。

从这个反应类型中，我们可以计算被切割的“平均”分值。在 DNA 末端，从 S1 到 S4 或从 S10 到 S13 的位点，各相距 10.0 碱基对的距离。在颗粒的中心，从 S4 到 S7 位点之间的距离是 10.7 个碱基对（因为这个分析是解决平均数的问题，位点不需要距离整数碱基对）。

在核心 DNA 上切割周期的变化（末端的 10.0，中间的 10.7）意味着核心 DNA 也存在着结构周期的变化。在中间部位的 DNA 每圈比它的溶解数含有更多的碱基对，但是在末端的 DNA 每圈含有少一些的碱基对。整个核小体的平均周期数只是 10.17bp/圈，这明显少于在溶液中 DNA 的数值 10.5。

核小体核心颗粒的晶体显示了 DNA 组织成了扁平的超螺旋形式，在组蛋白八聚体上缠绕了 1.65 圈。超螺旋的倾斜度有变化，因此在中间部位有一个不连续位点。高曲率的区域对称地排列，发生在±1 和±4 位置。这些与 S6 及 S8 和 S3 及 S11 相关，它们是对 DNase Ⅰ敏感性最小的位点。

高分辨率的核小体核心结构显示了 DNA 结构扭曲的细节。大多数的超螺旋发生在中心的 129bp 处，在这区域的 DNA 螺旋成直径为 80Å 的 1.59 圈的左手超螺旋（只是 DNA 自身双螺旋直径的 4 倍）。两个末端的任何一个末端序列对整个曲率都只有很少的贡献。

中心的 129bp 是 B 型 DNA，但是它具有形成超螺旋所需要的内在曲率。大沟平滑地弯曲，而小沟则含有陡峭的纽结。这些构象的变化可以解释为什么核小体 DNA 中心区域通常不是调节蛋白结合的靶点，这些调节蛋白很典型地结合到核心 DNA 的末端部分或者结合到连接序列上。

当抑制蛋白被移除后，DNA 沿着核小体表面的一条路径产生了大约 1 个负超螺旋。但是 DNA 在核小体上沿循的路径与－1.67 超螺旋相符（见图 6.29）。这个差异有时叫做连接数悖论（linking number paradox）。

核小体 DNA 平均数 10.17bp/圈与游离 DNA 10.5bp/圈之间的不同可以解释上面所提到的差异。对于一个 200bp 的核小体，它包含了 200/10.17＝19.67 圈；当 DNA 从核小体上解离后，它就只具有 200/10.5＝19.0 圈。在核小体上弯曲紧张度较小的 DNA 路径吸收了－0.67 圈，而这就解释了－1.67 的物理路径与测量得到的－1.0 超螺旋之间的差异。结果是一些作用于核小体 DNA 上的扭转压力使得每一圈上的碱基对数增加了，只有余下的被作为超螺旋检测。

6.19 组蛋白八聚体的组装

关键概念

- 组蛋白八聚体含有一个与两个 H2A·H2B 二聚体相连的 $H3_2 \cdot H4_2$ 四聚体的核。
- 每一个组蛋白都与其周围的组蛋白广泛地、互相交叉地联系。
- 所有组蛋白都有组蛋白折叠的结构基序。
- 组蛋白 N 端末尾从核小体上延伸出来。

迄今为止,人们已经从 DNA 是如何组织在核小体表面的角度考察了核小体的构造。从蛋白质的角度考虑,我们需要知道组蛋白之间是如何相互作用的和如何与 DNA 发生作用的。是只有在 DNA 存在的情况下组蛋白才能正确地起作用,还是它们具有独立地形成八聚体的能力?大多数关于组蛋白-组蛋白互作的证据表明了来源于它们具有形成稳定复合体能力的事实及其与核小体的交互连接的实验结果。

核心组蛋白形成两种类型的复合体:H3 和 H4 形成一个四聚体($H3_2 \cdot H4_2$);H2A 和 H2B 可形成多种不同的复合体,特别是一个二聚体(H2A·H2B)。

完整的组蛋白八聚体可以从染色质中提取,或(比较困难)通过体外实验在高盐和高蛋白质浓度条件下使组蛋白结合的方法获得。这个八聚体能失去一个 H2A·H2B 二聚体而形成一个六聚体的组蛋白;然后另一个 H2A·H2B 二聚体独自失去,剩下 $H3_2 \cdot H4_2$四聚体。这证明了一个组织形式:核小体含有一个包括 $H3_2 \cdot H4_2$四聚体中心的"核"。这个四聚体在体外实验中可以组织 DNA 形成颗粒,并且这个颗粒具有核心颗粒的一些特性。

交叉连接研究将这些关系进行延伸——显示出在核小体中哪些组蛋白对在核小体中是相互邻近的(利用这些数据的困难在于只有一少部分蛋白质发生交叉连接反应,所以在确定是否这些结果代表了典型的相互作用关系上需要小心谨慎)。源于这些数据,一个核小体组建模型已经建立,在图 6.40 中我们用图表的形式展示出来。

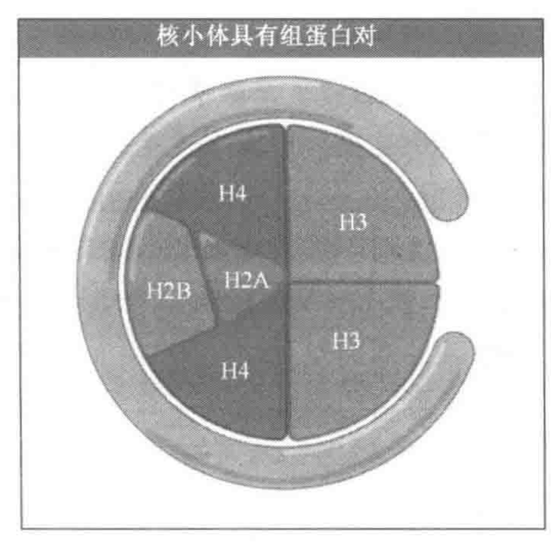


图 6.40 在核小体的一个对称模型中,$H3_2 \cdot H4_2$四聚体提供了确立其形状的核心,一个 H2A·H2B 二聚体可以在正面看出;另一个则在下面。

结构研究表明,分离的组蛋白八聚体的总体形状与核心颗粒是相似的,这就暗示了组蛋白-组蛋白相互作用建立了大致的结构;在组蛋白的相互作用行为和对交叉反应的应答基础上,每一个组蛋白的位置已经被安置于八聚体结构的特定区域。

晶体结构研究(分辨率 3.1Å)揭示了一种组蛋白八聚体模型,见图 6.41(见图版)。沿着晶体结构中单一多肽的主干路径,发现组蛋白并不是作为单一的球型蛋白组织起来的,而是每一个组蛋白都与其伙伴相互交叉结合:H3 结合 H4,而

H2A 结合 H2B。所以这个模型只区分了与 H2A · H2B 二聚体(蓝色)不同的 $H3_2$ · $H4_2$ 四聚体(白色),而并没有显示单一的组蛋白。

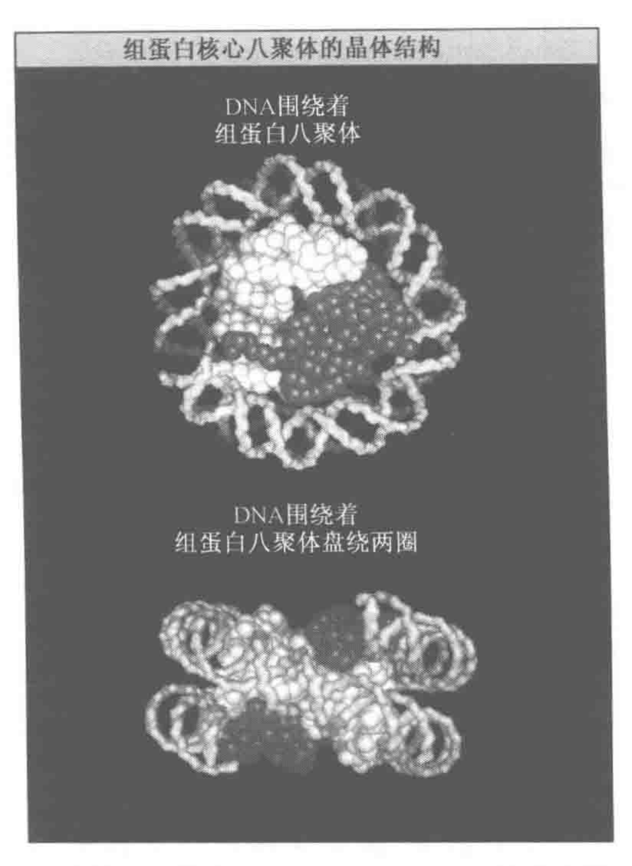


图 6.41 组蛋白核心八聚体的晶体结构可以用形状填充模型(shpe-filling model)来解释:$H3_2$ · $H4_2$四聚体用白色表示,H2A · H2B 二聚体用蓝色表示;在顶面观中,只有一个 H2A · H2B 二聚体能够观察到,因为另一个隐蔽在下面。DNA 的路径用绿色表示。照片由 Johns Hopkins 大学的 E. N. Moudrianakis 惠赠。

图中顶面观呈现了与图 6.40 显示出来的一样的含义。$H3_2$ · $H4_2$四聚体占据了八聚体的直径,它形成了马蹄铁样的形状;H2A · H2B 对作为两个二聚体安装到四聚体上,但是只有一个二聚体可以在这个视角中看到。侧面图呈现了与图 6.29 显示出来的一样的含义,其中 $H3_2$ · $H4_2$四聚体和分离的 H2A · H2B 二聚体的职能是可以区分的。蛋白质形成一种类似于缠线用的轴似的结构,这个线轴具有一个与 DNA 结合位点相符合的超螺旋轨道,使 DNA 在核小体中能以几乎完整的两圈缠绕起来。这个模型显示了一种关于一个轴的两侧对称性,它在侧面观的情况下呈现正交的走向。

对组蛋白位置的更详尽的观察结果在图 6.42 中显示出来(基于 2.8Å 分辨率的晶体结构)。上面的图显示了有关核小体一圈内各类型的一个组蛋白的位置(标号从 0 到 +7)。所有四种核心组蛋白显示了一个相似的结构类型——其中 3 个 α-螺旋由 2 个环(loop)连接,这被叫做组蛋白折叠(histone-fold)。这些区域相互作用形成新月型的异二聚体(heterodimer);每一个异二聚体结合 2.5 圈 DNA 双螺旋(在所描绘的 1 周当中,H2A · H2B 结合在+3.5~+6;$H3_2$ · $H4_2$结合在+0.5~+3)。结合几乎大部分发生在磷酸二酯键骨架上(都与组装 DNA 的需要一致,不管其序列如何)。$H3_2$ · $H4_2$四聚体的

形成是通过两个 H3 亚基互作实现的，如图的下半部分所示。

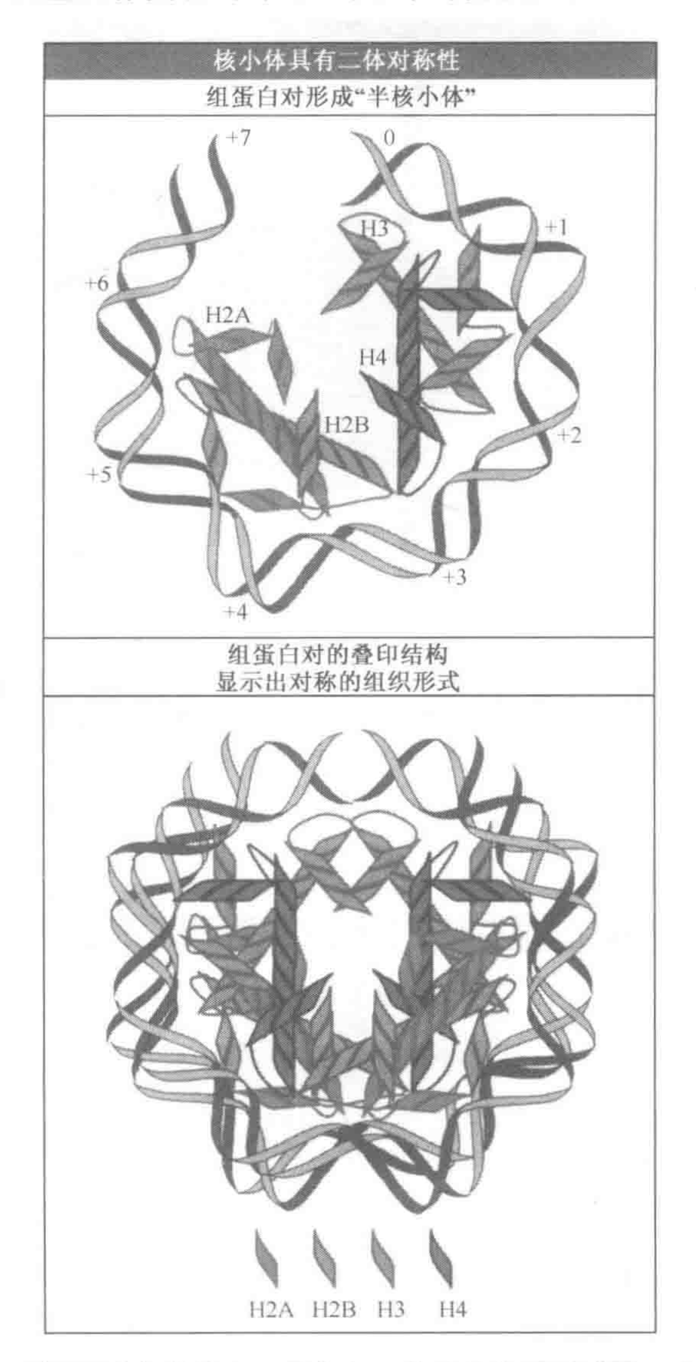


图 6.42 顶面观中每类核心组蛋白各一分子的位置显示了一个“半核小体”中的 $H3_2$ · $H4_2$ 和 H2A · H2B；在组蛋白对的叠印结构中可以看出核小体对称的组织形式。

每一个核心组蛋白具有一个球形的形体特征，这贡献了核小体中心蛋白质的量。每一个组蛋白还有一个灵活的 N 端尾部，在其上面具有可能对染色质功能有重要作用的修饰位点。大约占蛋白质量 1/4 的尾部的位置还并没有很好地确定下来，如图 6.43 所示。然而，可以看到 H3 和 H2B 的尾部在 DNA 超螺旋的圈中穿过，并且延伸出核小体，如图 6.44。通过紫外线照射将组蛋白尾与 DNA 相互交叉，则相对于核心颗粒获得了更多的核小体，这可能意味着尾部与连接 DNA 结合着。H4 的尾部似乎与邻近核小体的一个 H2A · H2B 二聚体结合，这可能是整个结构的一个重要特点。

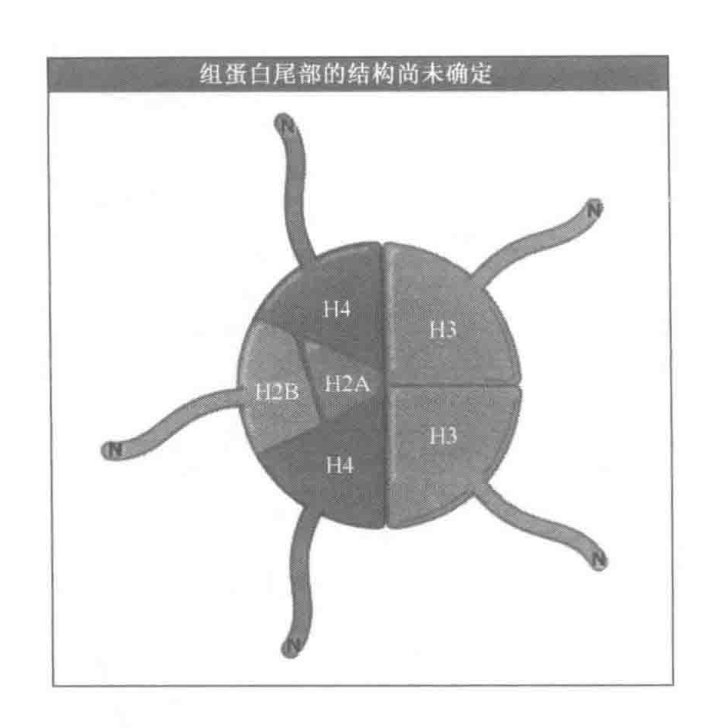


图 6.43　组蛋白球状体定位于核心颗粒的核心组蛋白八聚体中，但是其包含了修饰位点的 N 端尾部的定位关系尚不明确，可能是灵活可变的。

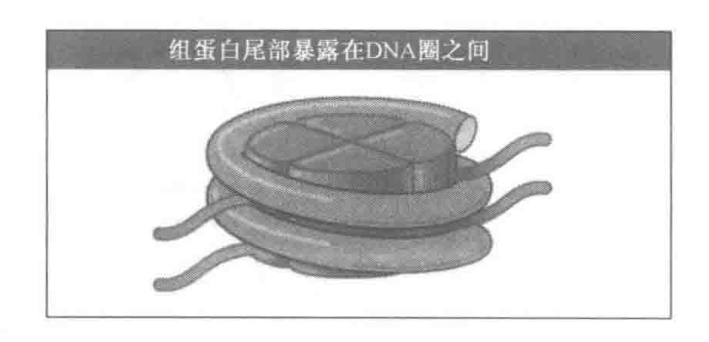


图 6.44　组蛋白 N 端尾部是无序的，在 DNA 圈之间露出核小体之外。

6.20　在染色质纤丝上核小体的分布路径

关键概念

- 10nm 的染色质纤丝由 30nm 纤维的折叠松开后形成，并由核小体串连成的线条组成。
- 30nm 的纤维每一圈含有 6 个核小体，形成螺线管。
- 在 30nm 纤维形成的过程中需要组蛋白 H1 的参与。

在电子显微镜下观察染色质时可以看到两种纤维：10nm 的纤维和 30nm 的纤维。它们都是使用纤维的近似直径表述的（实际上，30nm 纤维的直径有大约 25～30nm 的变化范围）。

10nm 的纤维实质上是线状的连续核小体串。确实在有些时候，它会呈现为更为伸展的连续区段，在这个区域中核小体可以被观察到念珠状的排列形式，如图 6.45 所示。在低离子强度下可以获得 10nm 纤维的结构，不需要组蛋白 H1 存在，这意味着它是核小体自身的一个严格的功能结构。它可被看作是一系列连续的核小体，如图 6.46。现在并不清楚是体内就存在这一结构，还是仅仅是在体外提取时的空间结构松解产物。

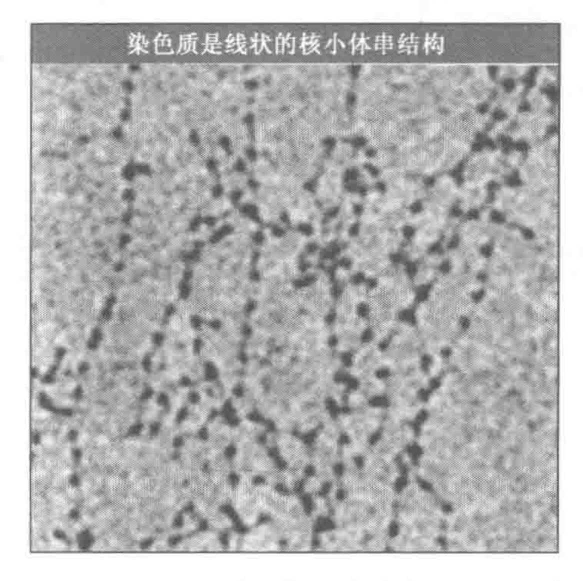


图 6.45　在空间处于松解状态的 10nm 纤维可以看出是由念珠状的核小体串组成的。照片由 California 大学 Irvine 分校的 Barbara A. Hamkalo 惠赠。

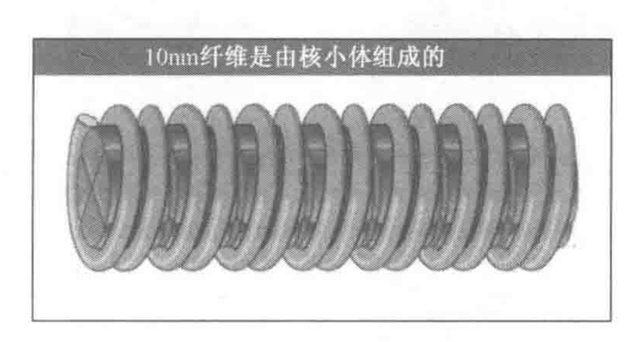


图 6.46　10nm 纤维是一个线形的核小体串珠状结构。

当染色质在较高离子强度的条件下被观察时，就可以得到 30nm 纤维的图像。图 6.47 中给出了一个例子。可以看出这种纤维具有潜在的螺旋结构。它每一圈中含有 6 个核小体，这与包装比例 40 相符（也就是说，沿着纤维轴每 1μm 含有 40μm 长的 DNA），其中 H1 的存在是必需的。这种纤维是间期染色质和有丝分裂期染色体的基本要素。

将核小体组装成染色质纤维的最有可能的格局是螺线管。在螺线管中核小体沿着一个中心空洞环绕，以螺旋阵列形成旋转的状态。螺线管有两种主要形式：一是单一的开端——自一个单一的线性阵列开始形成；二是双重开始，结果其中包括了两排核小体。图 6.48 显示的是一个两重开始的模式，这是由相互交叉相联的数据所表现出来——在 30nm 纤维中识别了两排核小体所堆叠的结构。

通过改变离子强度可以使 30nm 纤维和 10nm 纤维可逆转变。这暗示了在高离子强度和 H1 存在的情况下，核小体线性排列成的 10nm 纤维折叠成了 30nm 纤维。

尽管在 30nm 纤维的形成过程中 H1 是必需的，但是有关于其所在位置的信息仍然是存在矛盾的。它可以相对较容易地从染色质中提取的事实似乎证明它可能位于超螺旋纤维轴的外部，但是衍射实验的数据，以及在 10nm 纤维中保留着而 H1 而 30nm 纤维较难发现 H1 的事实，又表明它应该位于内部区域。

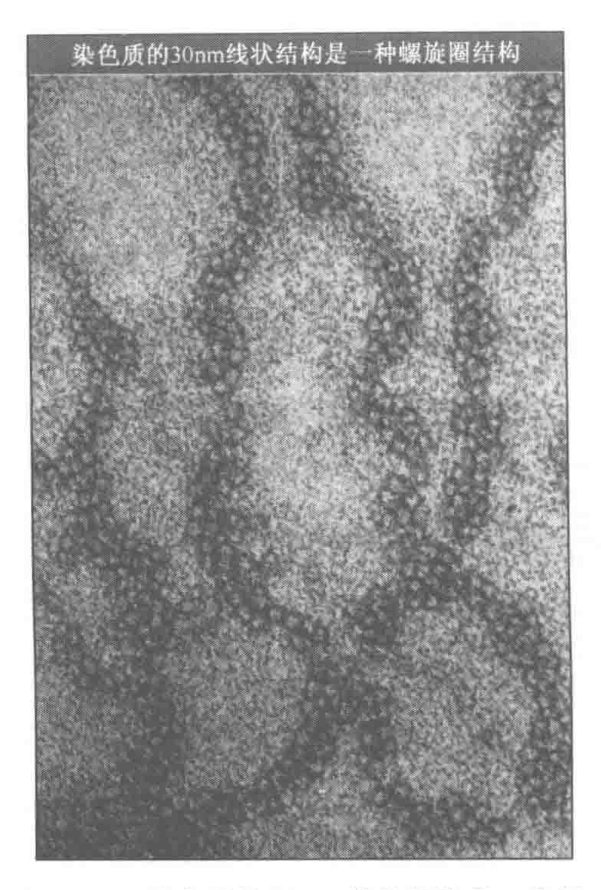


图 6.47 染色质的 30nm 线状结构是一种螺旋圈结构。照片由 California 大学 Irvine 分校的 Barbara A. Hamkalo 惠赠。

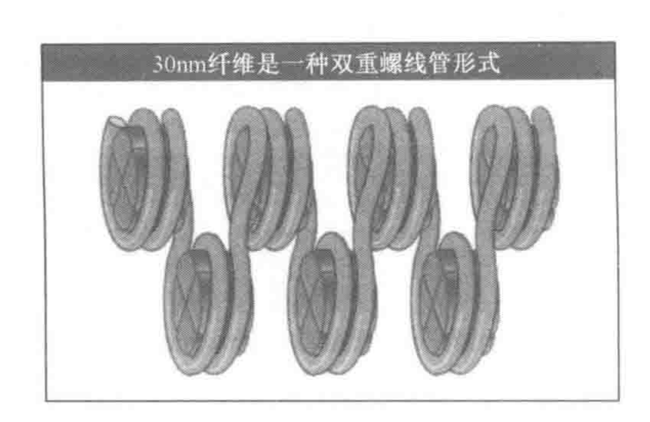


图 6.48 30nm 纤维呈现的一个螺旋带状结构，其中含有两排平行排列的盘绕成螺线管的核小体。

6.21 染色质的再生需要核小体的组装

关键概念

- 组蛋白八聚体在复制期间并不保守，但是 H2A · H2B 二聚体和 $H3_2 \cdot H4_2$ 四聚体却是保守的。
- 在复制期间和非依赖复制的组装过程中，核小体表现为不同的的组装方式。
- 核小体的组装需要辅助蛋白的辅助作用。
- CAF-1 是一个组装蛋白，它结合在复制体的 PCNA 亚基上，在复制过程中 $H3_2 \cdot H4_2$ 四聚体的解离需要它。
- 一个不同的组装蛋白和一个组蛋白 H3 变体可能被用于复制非依赖性的组装过程中。

在复制当中，DNA 的两条链被分开，因此必然会破坏核小体的结构。复制叉的结构是独特的，它对微球菌核酸酶有更高的抵抗力并且被降解成与核小体 DNA 不同大小的条带。这显示了结构转变的区域限制在直接邻近复制叉的位置。这暗示了一个大的蛋白质复合体参与了 DNA 复制，但是当复合体移动的时候，核小体在其后面立即或稍迟地重新形成。这一点显示于图 6.49 的电子显微镜图像中，图像表现了 DNA 最近的一个复制延伸，而在两条子代 DNA 双链部分已经组装成了核小体。

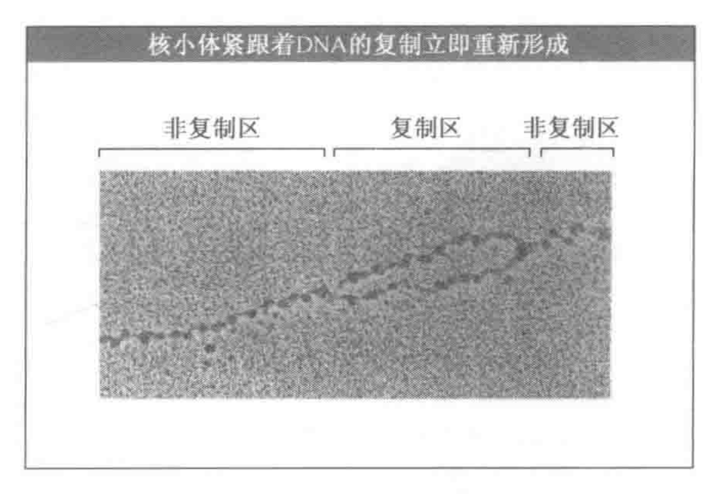


图 6.49 复制的 DNA 立即掺入到核小体之中。照片由 UT 西南医学中心的 Steven L. Mcknight 惠赠。

生化研究和对复制叉的观察都可以看出，核小体结构的破坏仅限于邻近复制叉的一小段区域。复制叉的前进破坏了核小体的结构，但是在复制叉向前移动时，在其后子代双链上核小体就又开始迅速地组装。事实上，核小体的组装与正在进行 DNA 复制的复制复合体直接相连。

组蛋白是怎么与 DNA 相结合产生核小体的呢？是不是组蛋白首先形成一个蛋白质八聚体，而 DNA 就随后缠绕在这个八聚体上？或者是组蛋白从游离组蛋白开始在 DNA 上组装成八聚体？图 6.50 显示这两种途径都可以在体外组装成核小体，取决于采用的条件。在一个途径中，一个预先形成的八聚体结合到 DNA 上；在另一个途径中，首先是 $H3_2 \cdot H4_2$ 四聚体结合到 DNA 上，然后两个 H2A · H2B 二聚体再结合上去。这两种途径都与体内发生的过程有关。第一种反映了可以通过组蛋白八聚体沿着 DNA 的移动重塑（remodel）染色质的能力（见 6.28 *染色质重塑是一个活跃的过程*）；第二种反映了一个适用于复制过程的途径。

辅助蛋白协助组蛋白结合到 DNA 上。这一角色的候选蛋白可以通过将组蛋白和外源 DNA 组装成核小体的提取物来确定。辅助蛋白作为“分子伴侣”（molecular chaperon）结合到组蛋白上，以便于可控地释放任何一个单一的组蛋白或蛋白质复合体（$H3_2 \cdot H4_2$ 或 H2A · H2B）到 DNA 上。这可能是必要的，因为组蛋白作为碱性蛋白具有对 DNA 较高的亲和力。这样的相互作用使得组蛋白形成核小体而不会陷入另一个动态的中间状态（换句话说，其他复合体都来源于组蛋白与 DNA 的间接结合）。

通过使用可以复制 SV40 DNA 并且能把产物组装到染色质上的人类细胞提取物，建立了一个复制过程中核小体组装的模拟系统。组装反应优先发生在正在复制的 DNA 上。它需要一个辅助因子 CAF-1，包括 5 个以上的亚基，分子质量为 238 kDa。CAF-1 通过 PCNA 被招募到复制叉上，PCNA 是 DNA 聚合酶的推进因子。这就提供了复制和核小体组装之间的联系桥梁，保证了一旦 DNA 发生复制，核小体就被组装。

CAF-1 以一定的化学计量关系起作用，并且通过结合到新合成的 H3 和 H4 而发挥功能。这就暗示了新的核小体的形成是首先组装 $H3_2 \cdot H4_2$ 四聚体，然后再加上 H2A · H2B 二聚体。体外组装的核小体具有一个 200bp 的重复 DNA 序列长度，尽管它们没有任何 H1 组蛋白，这意味着不需要 H1 就可以形成合适的空间架构。

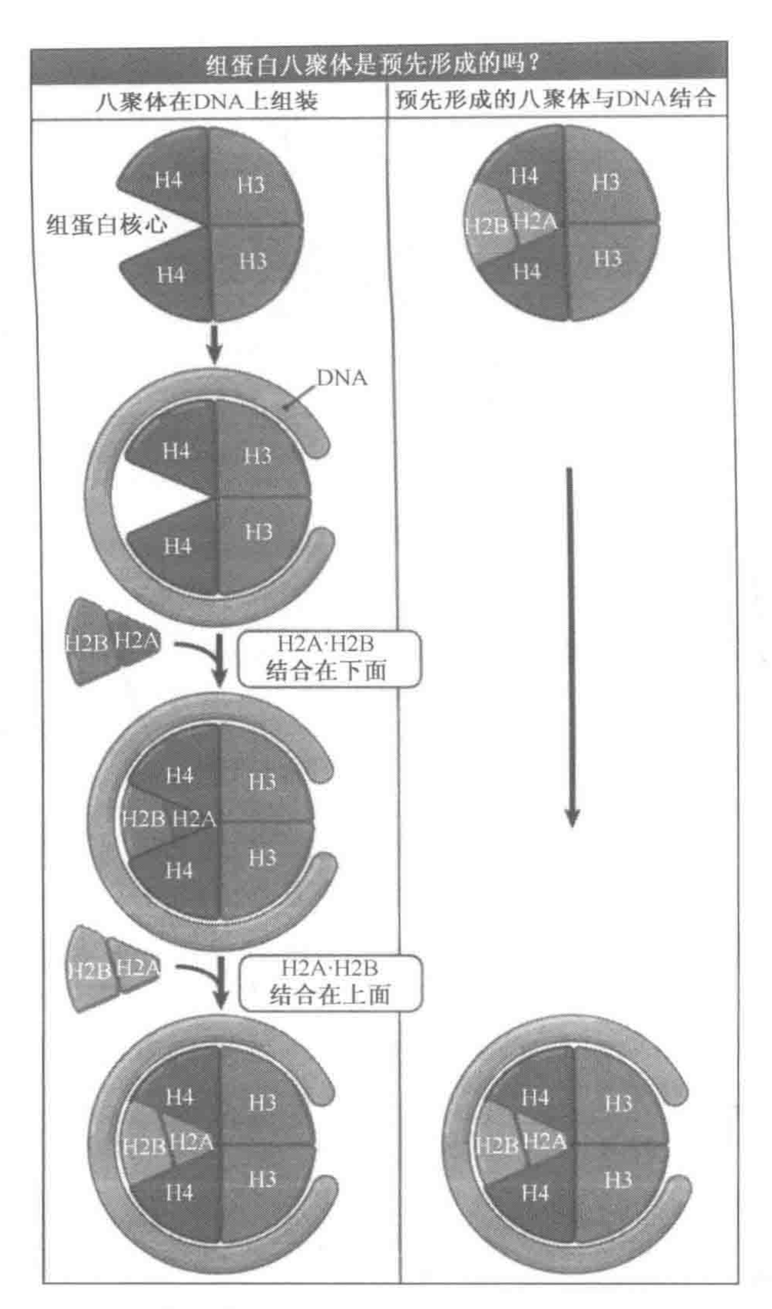


图 6.50　在体外，DNA 可以直接与完整的(交互连接的)组蛋白八聚体互作，也可以先与 $H3_2 \cdot H4_2$ 四聚体一起装配，然后添加上两个 H2A・H2B 二聚体。

当染色质生成时，已经和核小体相连的 DNA 伸展序列被复制，产生两个子代 DNA 双链。在这时，先前存在的核小体发生了什么事？是不是组蛋白八聚体解离成游离组蛋白被重新利用？或者是它们仍然处于组装状态？八聚体的完整性可以通过在重氨基酸生长的细胞中进行检测，在复制发生之前换成轻氨基酸，并且使用蛋白交联反应考察组蛋白八聚体是只有一种类型的氨基酸还是个混合物。结果显示，在复制发生之前就存在的核小体与在复制过程中合成的核小体形成了混合体，这就证明八聚体的成分至少发生了部分解聚和重新聚合。

解聚和重聚形式的特征很难详尽地确定，但是图 6.51 表示出了我们的工作模式。复制又代替了组蛋白八聚体，后者解聚成 $H3_2 \cdot H4_2$ 四聚体和 H2A・H2B 二聚体。这些“旧的”四聚体和二聚体进入一个库中，这个库也含有由新合成的组蛋白组装成的“新的”

四聚体和二聚体。核小体在复制叉后约600bp的距离进行组装。组装起始于当$H3_2 \cdot H4_2$四聚体结合到子代双链DNA上,这是由CAF-1辅助的。然后,两个H2A·H2B二聚体结合到每一个$H3_2 \cdot H4_2$四聚体上,以形成组蛋白八聚体。对于"旧的"和"新的"亚基而言,四聚体和二聚体的组装是随机的,这就解释了为什么在复制的八聚体中是"旧的"和"新的"亚基的混合体。在转录过程中,核小体的解聚和重新组装很可能也是以相似方

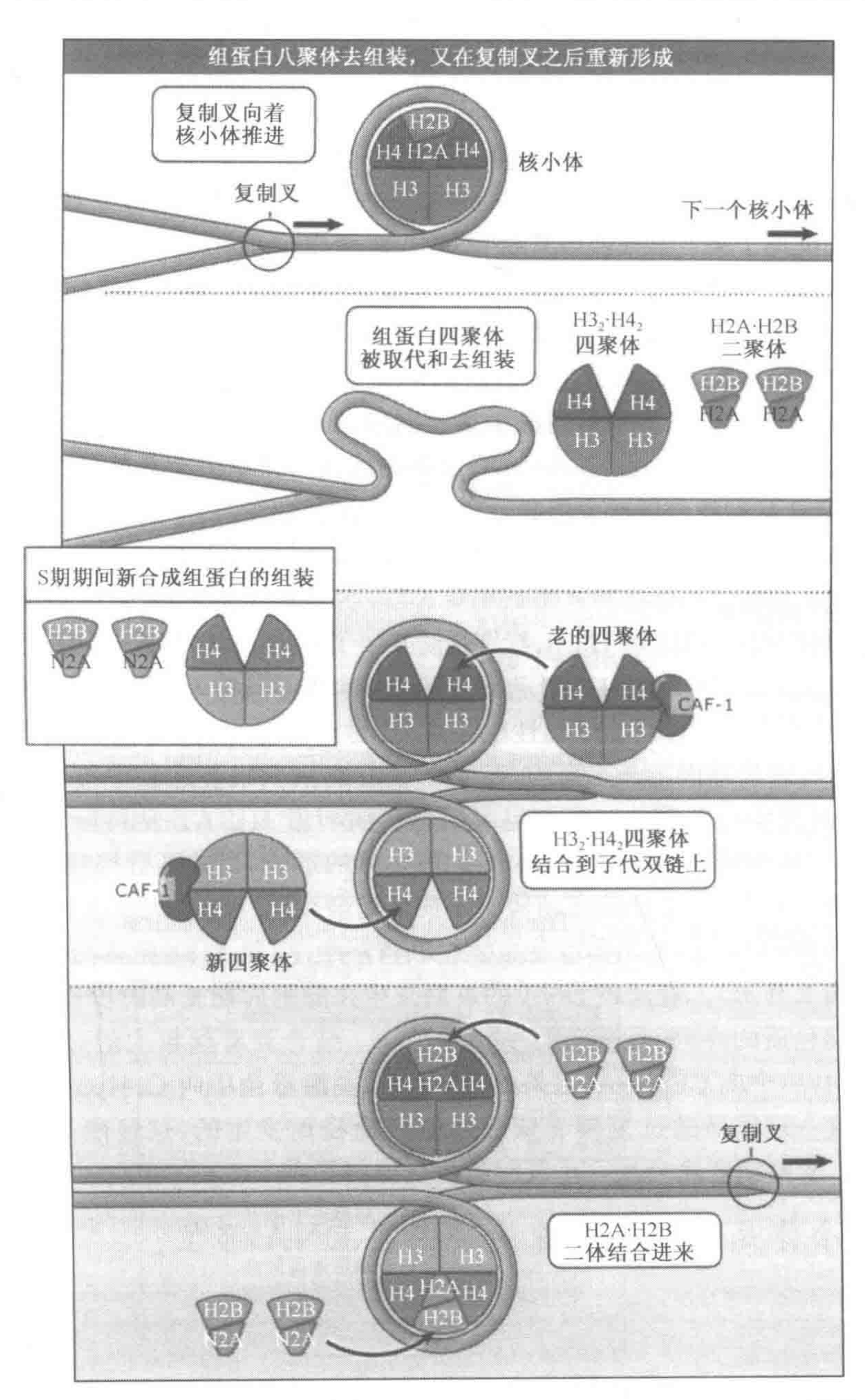


图6.51　复制叉通道取代DNA上的核小体八聚体。八聚体分裂成了$H_3 \cdot H_4$四聚体和$H_2A \cdot H_2B$二聚体。新合成的组蛋白装配到$H_3 \cdot H_4$四聚体和$H_2A \cdot H_2B$二聚体上。旧的和新的四聚体与二聚体在CAF-1的随机协助下组装到新核小体中——此过程紧随复制叉之后。

式进行的(见6.24 转录的基因是否被组装在核小体之中?)。

在真核细胞的S期(DNA复制时期),染色质复制需要足够的组蛋白合成以便于整个基因组的装配——最基本的是要合成与已经存在于核小体上的组蛋白相同量的组蛋白。组蛋白mRNA的合成作为细胞周期的一部分被控制,而且在S期大量增加。在S期从相等量的旧的和新的组蛋白混合物组装成染色质的途径叫做复制耦联(replication-coupled,RC)途径。

另一个途径称为复制非依赖性(replication-independent,RI)途径,为在细胞周期的其他阶段(DNA不合成的阶段)组装核小体而存在。作为DNA损伤所引起的后果,或者因为在转录过程中核小体被取代的缘故,这一途径变得很有必要。这种组装过程与复制耦联途径相比,必然有不同之处,因为它不能与复制装置连接。复制非依赖性途径最令人感兴趣的特点之一是它们使用了来自某些经历复制的DNA组蛋白的一些氨基酸变异体。

组蛋白H3.3变体与高度保守的H3的不同之处在于4个氨基酸位点上。在没有复制周期的分化细胞中H3.3慢慢地取代H3,它是作为新的组蛋白八聚体的组装取代那些不管什么原因从DNA上解离的组蛋白的结果而发生的。保证H3.3在复制非依赖途径中使用的机制在已经研究的两种情况中是不同的。

在原生动物四膜虫(*Tetrahymena*)中,组蛋白的使用只取决于其可获得的程度(可利用性)。组蛋白H3只在细胞周期中合成,而变异的取代性组蛋白只在不进行复制的细胞中合成。然而在果蝇属(*Drosophila*)昆虫中,有一个活跃途径保证H3.3被复制非依赖途径使用。包括H3.3的新核小体在转录位点组装,可能取代那些被RNA聚合酶替换的核小体。包装过程根据序列区分H3和H3.3,特别是防止了H3被利用。相反,复制耦联包装则使用两种类型的H3(尽管H3.3比H3可利用水平低得多因而只掺入少数核小体中)。

CAF-1可能不参与复制非依赖性组装途径[对于一些物种——例如酵母菌和拟南芥(*Arabidopsis*),它的基因不是主要的,暗示了在复制耦联组装途径中可能有其他组装过程]。有一个可能参与复制非依赖性组装的蛋白质叫做HIRA。从体内核小体组装系统中去掉HIRA,就抑制了在非复制DNA上核小体的形成,而并不会抑制复制的DNA上核小体的形成,说明这条途径确实使用了不同的组装机制。

包括选择性的H3的核小体组装也发生在着丝粒上(见6.31 异染色质的性质依赖于与组蛋白的相互作用)。着丝粒DNA的复制发生在细胞周期复制阶段的早期(相对于周围晚复制异染色质的序列;见MBIO:6-0001)。H3结合到着丝粒上的过程被抑制,在高级真核细胞中,一个叫CENP-A(在果蝇中叫Cid,在酵母菌中叫Cse4p)的蛋白质取代它得以结合。这一过程是通过复制非依赖性组装途径而发生的,这显然是因为当着丝粒DNA复制时,复制耦联途径在一小段时间内被抑制了。

6.22 核小体是否位于特殊的染色质DNA部位?

关键概念

- DNA局部结构或者与特定序列相互作用的蛋白质都可能导致核小体在特殊位置形成。
- 核小体的定位最常见的原因是当蛋白质结合到DNA上时形成了一个界限。
- 定位可能影响了哪一部分DNA位于连接DNA区域和DNA的哪一面暴露于核小体表面。

我们知道，在体外不管对于什么样的 DNA 序列，核小体都可以重组，但是这并不意味着它们在体内的形成也不依赖于序列。在体内，是否始终有一个与核小体拓扑学特性有关的特殊 DNA 序列位于一定的位置？或者，核小体随机地排列在 DNA 上，所以一段特殊的序列可以位于任何位置(例如，在基因组的一个拷贝上位于核心区域，在另一个拷贝上位于连接区域)？

要研究这个问题，使用一个确定序列的 DNA 是必要的；或者更确切地说，我们需要确定一个与核小体在 DNA 上的特定点相关的位置。图 6.52 表明了用于达到这个目的程序的原理。

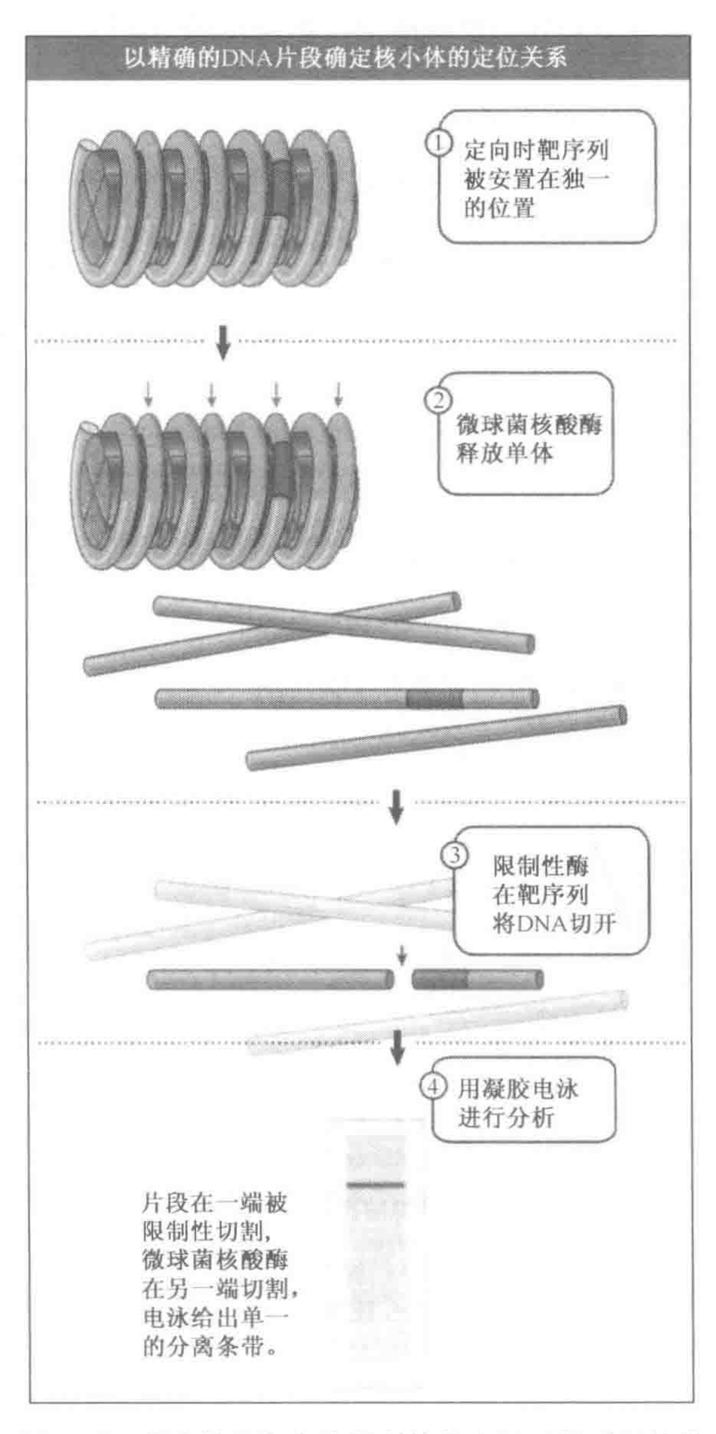


图 6.52　核小体的定位将限制性位点置于相对于被微球菌核酸酶酶切的连接 DNA 位点的独特的位置。

假定 DNA 序列只以一种特殊构象组织到核小体中，所以在 DNA 上每一个位点往往位于核小体上一个特殊的位置。这种类型的组织方式叫做核小体定位(nucleosome positioning)[或有时叫做核小体定相(nucleosome phasing)]。在一系列被定位的核小体上，DNA 的连接区域包含了唯一的位点。

现在我们只考虑一个核小体的情况。用微球菌核酸酶切割产生了一个单体片段组成特殊序列。如果 DNA 被分离并且用在这个片段上只有一个目标位点的限制性酶切割，它就只能在一个唯一位点上被切割，这产生了两个具有唯一大小的片段。

通过凝胶电泳，可对微球菌核酸酶/限制性酶双降解后的产物进行分离。一个代表了限制性位点一侧序列的探针被用于在双酶切产物中识别相应的片段。这个技术叫做**间接末端标记(indirect end labeling)**。

将论据调转，对一个单一的清晰条带的识别证明，一个限制性位点的位置唯一地定位于相对于核小体 DNA 末端的位置(就像通过微球菌核酸酶切割确定的那样)。所以核小体含有唯一的 DNA 序列。

如果核小体并没有位于一个单一位置，将会发生什么呢？现在，在每一个基因组拷贝中连接区域包括着不同的 DNA 序列，所以每一次的限制性酶切位点都位于不同的位置。事实上，相对于单体核小体 DNA，它位于所有可能的位置。图 6.53(见图版)显示，双酶切割后产生了一个大的、弥散的、大小从最小的可见片段(大约 20 个碱基对)到单体 DNA 长度的序列范围。

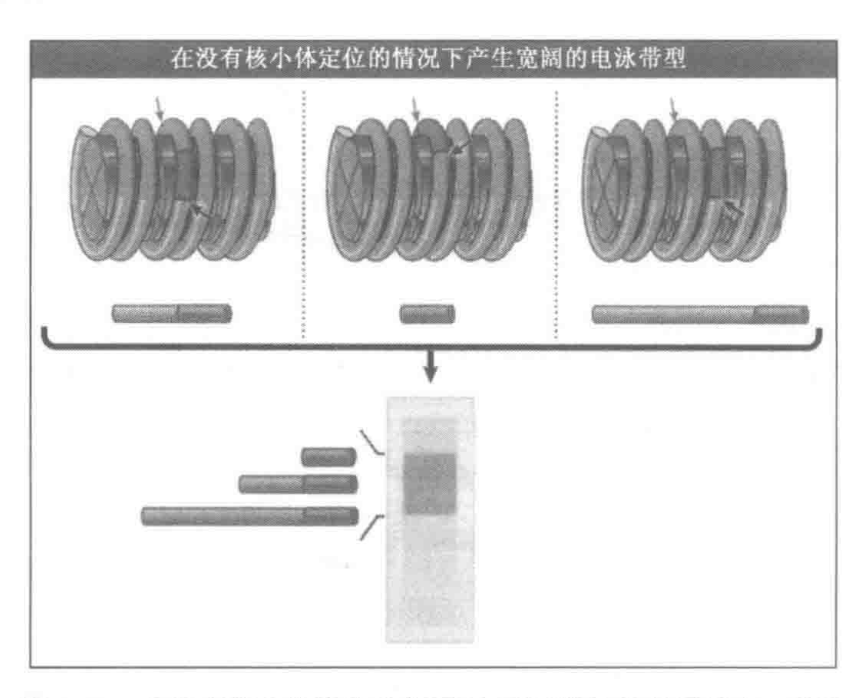


图 6.53 在没有核小体定位的情况下，不同拷贝的基因组中一种限制性位点存在于所有可能的位置，当一种限制酶在目标位点(红色)切割、微球菌核酸酶在核小体之间的连接处(绿色)切割时，所有可能大小的片段都可能产生。

核小体定位的完成可能通过下面两种途径之一：

• 它是内在的：每一个核小体都被特殊地定位于一个特定 DNA 序列上。这改变了我们以往认为核小体作为一个亚基可以在任何 DNA 序列和组蛋白八聚体之间形成的

观点。

• 它是外在的：在一个区域的第一个核小体优先在一个特殊的位点组装。核小体定位的优先起始位点来源于核小体移除区域的存在。这个移除区域提供了限制用于邻近的核小体定位的界限。然后，一系列的核小体可以以一个确定的重复序列长度进行有序的组装。

现在清楚地知道，DNA 上核小体八聚体的解离对于序列而言并不是随机的。在一些情况下其形式是内在的，其中起决定作用的是 DNA 的结构特点；在另一些情况下其形式是外在的，这时它起因于其他蛋白质与 DNA 和(或)组蛋白的相互作用。

DNA 的某些结构特点影响了组蛋白八聚体的取代。DNA 具有向一个方向弯曲而不向另一个方向弯曲的内在倾向性。因此，富含 AT 的区域采取特殊的定位方式以使小沟面向八聚体，而富含 GC 的区域有特别的排列方式以使小沟突出。dA・dT 的长延伸(>8 bp)避免了超螺旋圈在核小体核心中部位置的定位。目前还不可能去总结所有相关的结构效应，而且因此也不可能完全地预测相对于核小体特殊 DNA 序列的定位状况。导致 DNA 采取极端结构模式的序列可能带来一些影响——例如核小体的移除，因此可以引起边界效应(boundery effect)。

核小体在边界附近定位是常见的。如果核小体结构具有一些变异(例如，如果连接 DNA 长度变化了 10bp)，位置特异性将自第一个确定在边界的核小体向远处衰减。在这种情况下，我们可以预见定位的位置仍然保持严格地只在界限附近。

DNA 在核小体中的位置可以以两种方式表述。图 6.54 显示的**翻译定位(translational position)**描述了相对于核小体边界的 DNA 位置。特别的，它决定了哪些序列可以在连接区域内发现。DNA 的 10bp 转变使得下一个圈进入了连接区域。所以，翻译定位决定了哪些区域更容易被接近(至少从对微球菌核酸酶敏感性上判断是如此)。

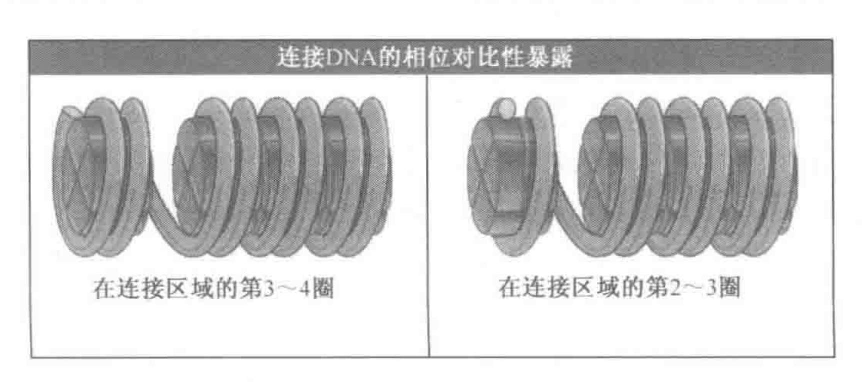


图 6.54　翻译定位描述了相对于组蛋白八聚体的 DNA 线性位置，10 bp 的 DNA 替代改变了处于更暴露的连接区的序列，但是并不改变 DNA 哪一面被组蛋白表面保护，哪一面暴露于外界。

因为 DNA 位于组蛋白八聚体的外侧，有一个面不管具有任何特殊序列都要被组蛋白所隐匿，而另一面则是可接近的。依赖于相对于核小体的定位，必然被一种调节蛋白所识别的一个 DNA 上的位点可能不可接近，也可能可以利用。因此，与 DNA 序列相对的组蛋白八聚体的精确位置可能非常重要。图 6.55 显示了相对于八聚体表面的双螺旋的旋转定位(rotational positioning)效果。如果 DNA 移动了部分圈数(想像对于蛋白质表面来说 DNA 旋转了)，暴露于外部的序列将发生改变。

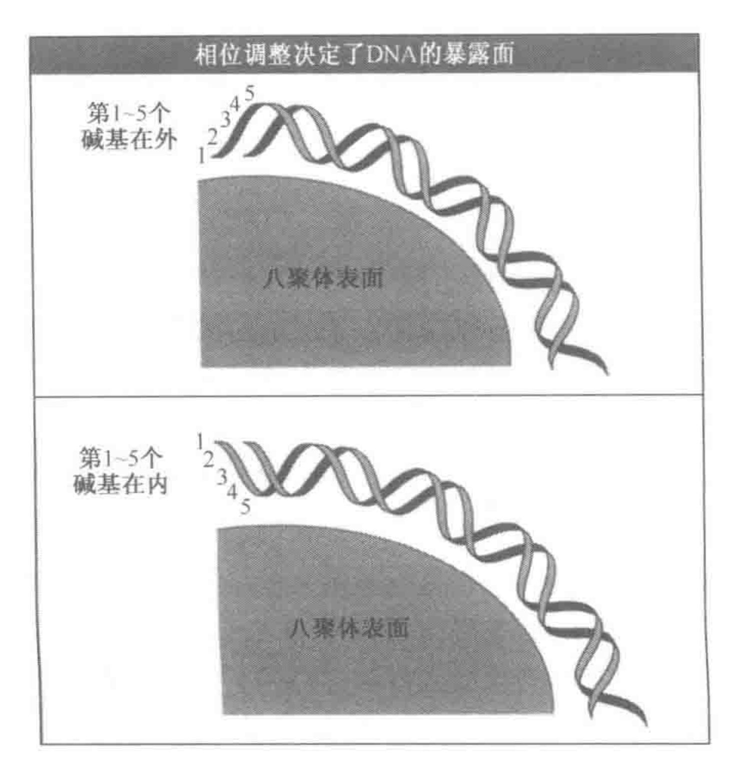


图 6.55 旋转定位描述了核小体表面 DNA 的暴露情况。任何与螺旋重复单位(约 10.2 bp/圈)不同的移动将取代与组蛋白表面联系的 DNA。处于内部的核苷酸比外部的更受到保护,以免受核酸酶的破坏。

在控制与 DNA 接近的过程中,翻译定位和旋转定位都是重要的。定位过程特点的最好描述是在启动子处核小体的特殊替代例子。翻译定位和(或)核小体从一个特殊序列被移除可能都是必需的,它使得转录复合体得以形成。只有将核小体解开,释放游离的 DNA,一些转录调控因子才可以结合到 DNA 上,这产生了一个转录定位的界面。在其他情况下,调控因子也可以在核小体表面与 DNA 结合,但是这时旋转定位机制就很重要,以确保带有合适的靶位点(contract point)序列的 DNA 那一面被暴露出来。我们在 MBIO:6-0002中来讨论核小体的组装与转录之间的联系。

6.23 结构域的含义是包含转录活性基因的区域

关键概念

- 一个包含有转录活性基因的结构域根据其对 DNAase Ⅰ降解敏感性的增加来定义。

基因组中包含转录活性基因的区域一般都有发生过改变的结构。结构改变早于且不同于由 RNA 聚合酶的实际通过而引起的核小体结构破坏。转录中染色质结构改变的一个指标就是其对 DNAase Ⅰ降解的敏感性增加。这样,DNAase Ⅰ敏感性就定义了一个染色体结构域,即一个结构发生了改变的、包含有至少一个转录活性单位,有时在此基础上还有进一步向两边扩展的区域[注意用结构域(domain)一词,同根据染色质或染色体袢环所定义的结构性结构域并没有任何关联]。

用 DNAase Ⅰ消化染色质,最终将会降解成一些酸溶性物质(很小的 DNA 片段)。

整个反应进程可以根据变成酸溶性 DNA 的比例来追踪。若只有 10%的总 DNA 变成酸溶性，那么一个活性基因中多达 50%的 DNA 将会丢失。这提示活性基因是被选择性降解的。

单个基因的命运可以通过对反应后存留下来可以与特定探针反应的 DNA 的定量来判断。具体实验步骤在图 6.56 中进行概括说明。总的原则是，一个特殊意义片段的丢失意味着 DNA 中相应区域被酶解掉了。

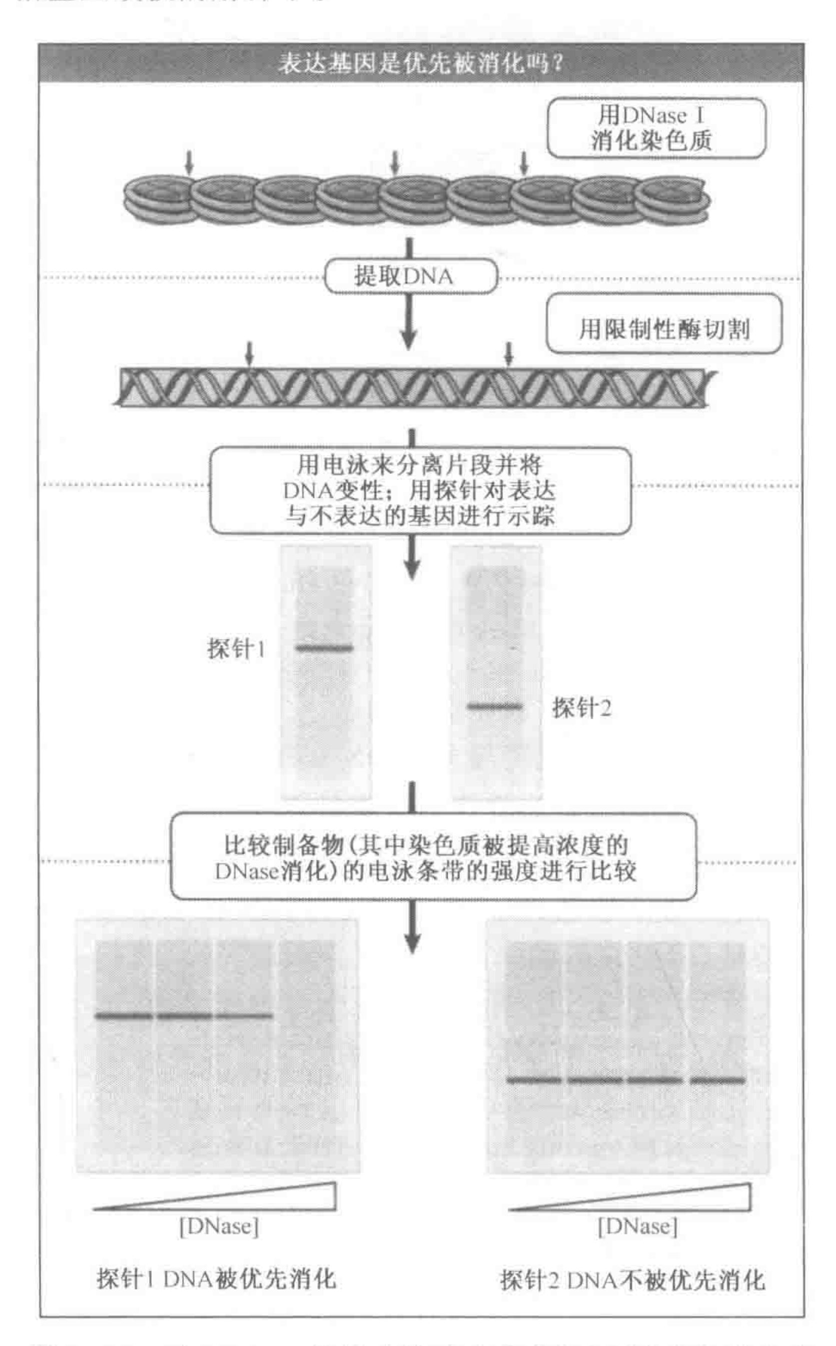


图 6.56 对 DNAase 的敏感性可以通过确定用特定探针杂交时染色质物质的消失率来衡量。

由此可见染色质主体相对来说抗 DNase Ⅰ的降解，而且含有不表达的基因(还包括其他一些序列)。一般一个基因在其表达的组织中显示出特别高的 DNase Ⅰ敏感性。

图 6.57 显示的是从鸡红细胞(其中珠蛋白基因可以表达，而卵清蛋白基因没有表达活性)提取的染色质中 β-珠蛋白基因和卵清蛋白基因所发生的事件。代表 β-珠蛋白基因

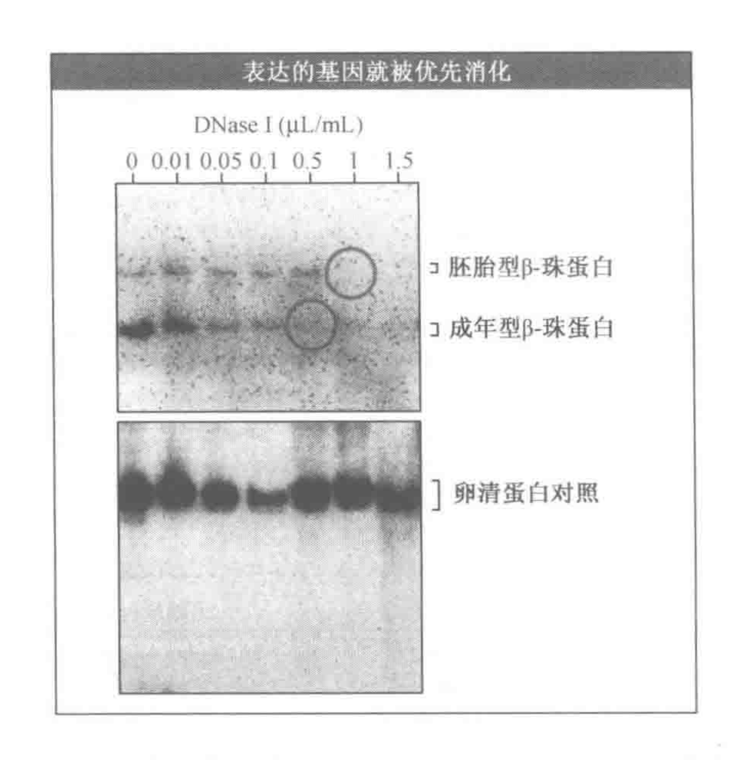


图 6.57 在成年红细胞中，成年型 β-珠蛋白对 DNase Ⅰ的消化敏感，胚胎型 β-珠蛋白对 DNase Ⅰ的消化部分敏感（可能是因为分散效应），但是卵清蛋白不敏感。照片由 Fred Hutchinson 癌症研究中心的 Harold Weintraub 和 Mark Groudine 惠赠。

的限制性片段很快丢失，相反那些代表卵清蛋白基因的限制性片段显示该基因很少被降解（事实上卵清蛋白基因被降解的速度与主体 DNA 降解的速度相似）。

那么选择性敏感性仅是那些表达活性非常高的基因（如珠蛋白基因）所特有的特点，还是所有有表达活性基因的特点呢？通过应用代表整个细胞全部 mRNA 群体的探针所做的实验显示，所有的表达活性基因（不管是编码大量 mRNA 还是稀有 mRNA）都对 DNase Ⅰ有选择敏感性（然而它们的敏感性程度存在差异）。既然事实上在任何时候稀有表达的基因通常有非常少的 RNA 聚合酶分子参与到转录中，那么这就揭示对 DNase Ⅰ的敏感性并不是转录过程产生的结果，而是所有能够被转录的基因的一个特征。

什么是优先选择性敏感性区域的范围呢？可以运用代表转录单位本身以及其侧翼区域的一系列探针来确定这个范围。通常敏感性区域会跨越整个转录区域；另外在该区域附近两侧若干 kb 的区域显示中等程度的敏感性（可能是由于扩展效应的结果）。

暗含在这个结构域的描述中的主要概念是：结构域是一个跨越很大范围的、对 DNase Ⅰ具有高度敏感性的区域。通常我们认为在转录中的一些调控事件发生在 DNA 中的一个独立位点上，例如赋予在启动子区域起始转录能力的位点。尽管这是正确的，这样的调控仍必然决定了（或者必须伴随着）更大范围的结构改变。这是真核生物与原核生物所体现的不同特征。

6.24 转录的基因是否被组装在核小体之中?

关键概念

- 在转录与非转录基因中DNA被微球菌核酸酶消化时,发现核小体的几率相同。
- 在一些大量表达的基因中发生的特殊罕见现象就是缺乏核小体。

在使转录中的基因可视化的尝试中产生了相互冲突的结果。下面两个图就显示了两个极端。

可以看到大量转录的染色质由于太伸展以致不能被包装到核小体中。如图6.58所示,在高度表达的编码rRNA的基因中,极度包装的RNA聚合酶使得DNA很难被看见。因为RNA被蛋白质紧密包裹,我们不能直接测量rRNA转录物的长度,但是可以通过rRNA的序列来推断转录物应该是多长。被转录DNA片段的长度可以通过"圣诞树"主轴的长度来度量,大约为rRNA长度的85%。这意味着该基因的DNA几乎完全伸展。

另一方面,在受SV40感染的细胞中可以抽提到该病毒的微小染色体(minichromosome)的转录复合体。它们含有组蛋白的通常组分而且呈串珠状结构。可以观察到RNA链从微小染色体中伸出,如图6.59所示。这说明当SV40的DNA被包装成核小体后转录仍可以继续。当然,SV40微小染色体被转录的频率低于rRNA基因。

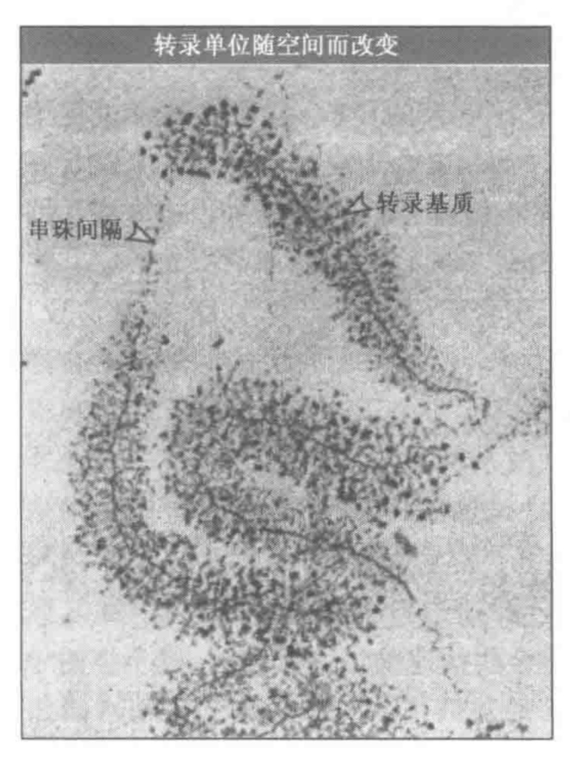


图6.58 一个rDNA转录单位的延伸轴随着只轻微地降低伸展度的非转录间隔而改变。照片由Victoria Foe, Tean Chooi和Charles Laird惠赠。

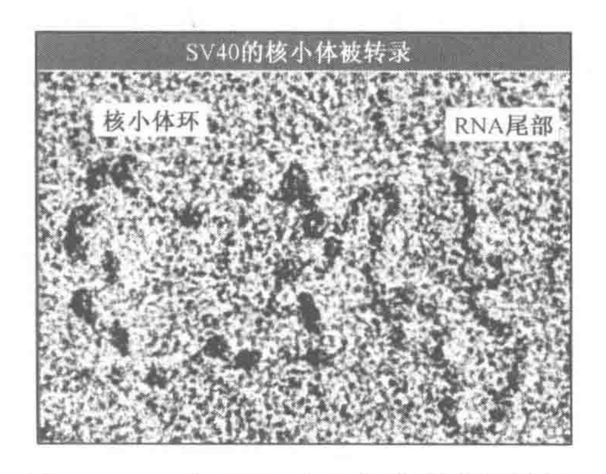


图6.59 一个SV40小染色体可以被转录。照片由France大学的Pierre Chambon惠赠。复制自*J. Mol. Bio.* vol. 131, Gariglio, P., et al., *The template of the isolated* …, p. 131. 1979,获得Elsevier许可。

转录中包含着DNA的解链，并可能需要纤维在染色质的限制区域解折叠。一个想当然的观点认为一些“可自由活动的空间(elbow-room)”在此过程中是必需的。先前描述的多线染色体和灯刷染色体的特征提示，一个更膨大的结构组织方式与基因表达有关。

对转录活性基因要问的首要问题是正在被转录的DNA是否仍然被包装成核小体结构？若组蛋白八聚体被移开，它们是否仍以某种方式与被转录的DNA相结合？

一种实验方法是用微球菌核酸酶消化染色质，然后用某个或某些基因的探针来确定是否相应片段是以预期的浓度和200 bp倍数梯度的长度呈现。我们能从这些实验中得到的结论虽有限但很重要。正在被转录的基因所含核小体的几率与非转录序列的一样。所以为了被转录，基因并非必须进入另一种包装形式。

然而既然通常被转录的基因在任何时候可能仅含有一个RNA聚合酶，这就不能揭示实际上在有聚合酶介入的位点上所发生的真实事件。一方面可能它们仍然保留其核小体；另一方面更可能是当RNA聚合酶穿过时，核小体暂时被替代，但是随后又被迅速重新形成了。

6.25 转录中组蛋白八聚体被替换

关键概念

- 在一个模型系统中，转录时RNA聚合酶置换了组蛋白八聚体，但是八聚体在聚合酶刚通过后就迅速与DNA重新结合。
- 当转录过程通过一个基因以后，其中的核小体重新构建。

检测RNA聚合酶是否能够直接通过核小体进行转录的实验，说明在转录过程中组蛋白八聚体被移开。图6.60显示的是T7噬菌体RNA聚合酶在体外转录一个仅含有一个八聚体核心的小片段DNA所发生的事件。该核心仍与DNA结合，只是结合到不同的位置。该核心很可能还会重新结合到其初始被移开的DNA区域。

图6.61显示的是一个聚合酶通过的模型。当聚合酶进入核小体时，DNA被移位，但是聚合酶又到达一个位置，使得DNA环回并重新结合，形成一个封闭的区域。聚合酶不断前进，使DNA去折叠，同时又在该DNA环中形成了一个正超螺旋；其结果是戏剧性的，因为该封闭环仅80bp，所以聚合酶通过的每对碱基都对该正超螺旋形成一个显著的增加值。事实上，聚合酶容易通过前面的30bp而进入核小体；此后它在前进过程中仿佛遇到不断增加的阻力，向前行进得更加缓慢。每10bp发生一次暂停，提示该环形结构在每轮DNA上施加一个对旋转的约束力。当该聚合酶到达核小体的中央位置(在二面对称的轴上添加后续的基数是必要的)，暂停结束，聚合酶快速前进。这表明：核小体的中点代表了八聚体替换的位置(可能是因为正超螺旋已经达到了某一临界水平而使八聚体与DNA分离)。这释放了聚合酶前部的张力，使得聚合过程继续进行。随后，核小体八聚体核心结合到聚合酶后部的DNA上，并且不再会对聚合过程产生阻碍。很可能八聚体在改变位置时并不完全失去与DNA的联系。

被释放的八聚体是作为一个完整单元存在的吗？八聚体内蛋白质的交联确实不能阻碍转录的进行，甚至当交联广泛到足以确保核心组蛋白的中央已经交联的时候，转录仍能继续。这暗示了转录的进行不需要八聚体分离成它的组蛋白组分水平，并且可能也不需

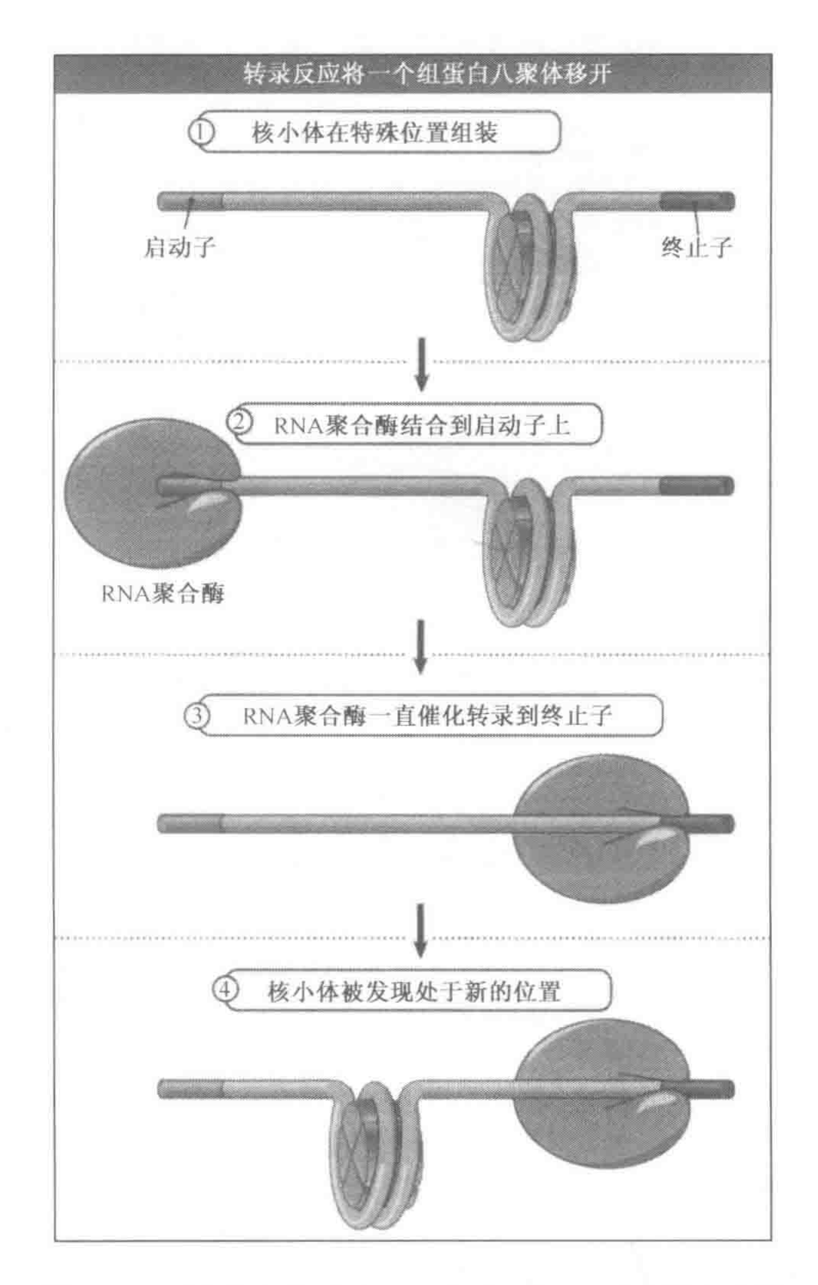


图 6.60　核小体上转录效果的检测程序，显示组蛋白八聚体被从 DNA 上移开并重新在另一位置结合。

要所有中心结构的展开。然而，向这一系统中加入组蛋白 H1 就会引起转录水平的迅速下降。由此产生两个结论：组蛋白八聚体（无论其保持在核小体结构上或被替换）是作为一个完整的单位起作用的；将 H1 从活性染色质移开或是以某种方式调整其相互作用的方式是必要的。

所以，在转录过程中，一个小的 RNA 聚合酶能够取代一个核小体。这一核小体在随后的转录过程中又重新形成。当然，在真核细胞核中这一过程更加复杂。RNA 聚合酶更加大，并且这一过程的障碍物是一连串相连的核小体。克服这一障碍需要一些附加因子作用于染色质。

核小体的组织可能因转录而改变。图 6.62 展示的是酵母菌的 *URA3* 基因在可诱导的启动子控制下转录进行时产生的结果。定位是通过使用微球菌核酸酶检查与基因 5′ 端的一个限制性酶切位点相关的切割位点来探究的。最初，这一基因展示一种类型的核

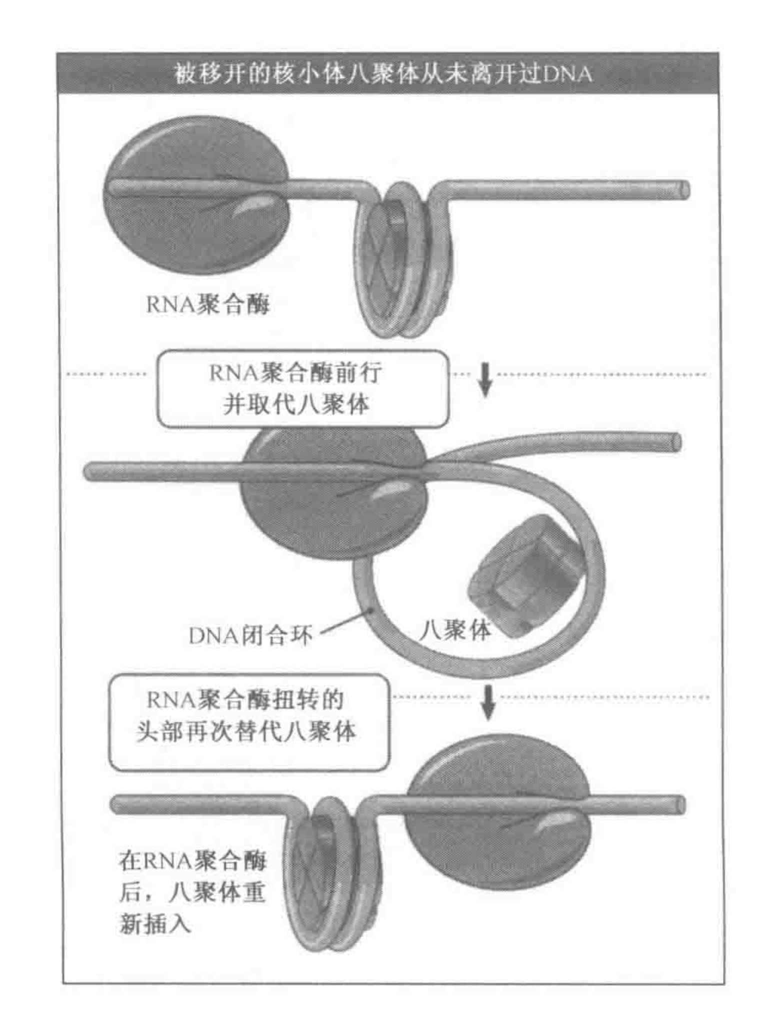


图 6.61　RNA 聚合酶在其行进中将 DNA 从其组蛋白八聚体上移开。DNA 环回并重新附着(到聚合酶或八聚体上)形成一个闭合环状结构。当聚合酶继续推进时，它在前面产生一个正超螺旋。这一过程移开了八聚体，但八聚体仍与 DNA 或聚合酶结合，并在 RNA 聚合酶之后重新插入(到 DNA 盘绕结构中)。

小体，这种核小体从启动子开始延伸通过基因上的一大段距离而被组装，其定位在 3′区域消失。当这一基因表达时，一种普遍的散居核小体代替了被定位类型的核小体。所以，核小体以同样的密度存在，但是不再被组织到相位中。这说明转录破坏了核小体的定位。当抑制作用重新建立时，定位会在 10min 内出现(尽管并不完整)。核小体的定位无须复制就能被调整，这一结果使人们产生了新的兴趣点。

统一的模型假设，RNA 聚合酶在其行进中代替组蛋白八聚体。如果聚合酶后面的 DNA 暴露，八聚体将重新结合其上[八聚体可能从未完全失去与 DNA 的联系。八聚体如何在不松开、不丢失组分的情况下，作为比自身沿 DNA 行进时更大的个体，维持与 DNA 的联系，仍然是一个迷。可能八聚体通过与 RNA 聚合酶的接触产生的作用而被拉回(passed back)]。如果没有可用的 DNA，例如另一个聚合酶紧密地结合于第一个之后，那么八聚体就可能被持久地替换，并且 DNA 可能维持在延伸的形式中。

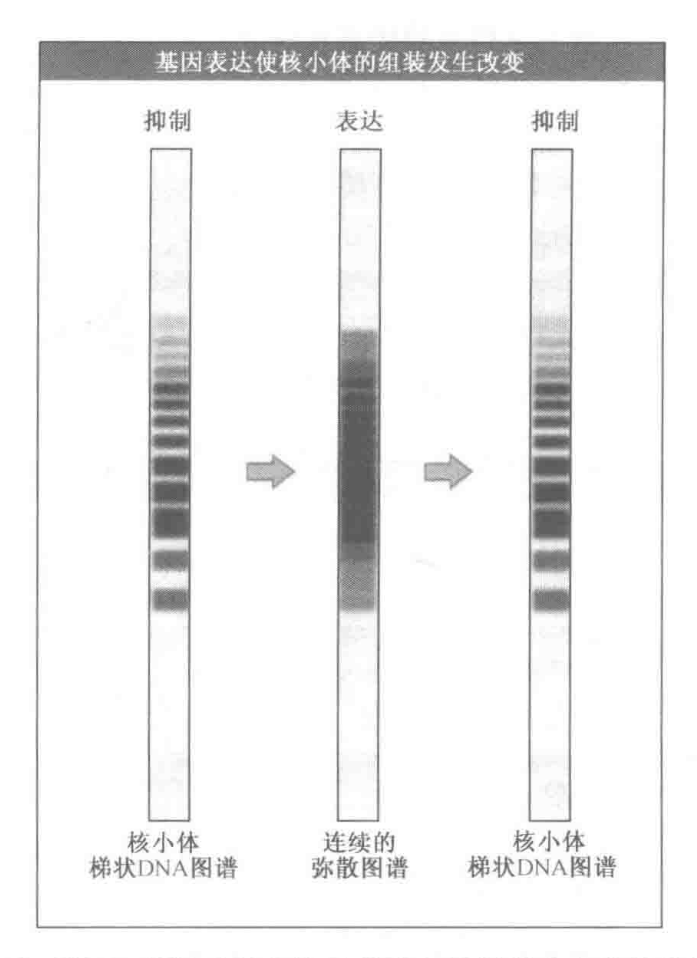


图 6.62 *URA3* 基因已经在转录前确立了与核小体的定位关系。当转录被诱导时，核小体的定位是随机的；当转录抑制时，核小体又会恢复其特定的定位关系。

6.26 核小体替换和重新组装需要特殊因子

关键概念

- **转录过程中 RNA 聚合酶替换八聚体和转录后组蛋白重新组装到核小体中都需要辅助因子。**

对于转录的所有阶段来说，从 DNA 上替换核小体是一个关键条件。这一过程在其起始阶段的特征已经被很好地认识。活性的启动子以对 DNA 酶高度敏感的位点为标志，因为组蛋白八聚体已经被从 DNA 上替换下来（见 6.27DNA 酶高度敏感位点改变染色质的结构）。八聚体的移开需要重塑复合体（remodeling complex）。复合体由转录因子招募，并且利用 ATP 水解产生的能量改变染色质的结构（参见 MBIO：6-0003）。这意味着 RNA 聚合酶合成 RNA 开始发生在一小段未被核小体阻碍的短片段 DNA 上。由于它延伸过程中的继续前进，位于前面的组蛋白八聚体必须被代替。随后，为了防止后面产生裸露的 DNA，八聚体必须随转录后重新形成。

在体外实验中，通过 RNA 聚合酶Ⅱ的转录需要一个称为 FACT[FACT，facilitates chromatin transcription（促染色质转录）的缩写，不是 RNA 聚合酶的组成部分，但与转录延伸阶段有特殊联系]的蛋白质。这个蛋白质的行为与转录延伸因子相似。FACT 由两

个亚基组成，并且其亚基在所有真核生物中高度保守。FACT 与活性基因的染色质结合。

将 FACT 加入到被分离的核小体中，可以引起核小体失去 H2A·H2B 二聚体；在体外转录过程中，它将核小体转变成丢失了 H2A·H2B 二聚体的"六聚体"。这表明 FACT 是转录过程中分离八聚体机制中的部分作用成分。FACT 可能也涉及核小体的转录后组装，因为它帮助核小体由核心组蛋白形成。

这表明了图 6.63 中所示的模型。在图中，FACT 将 H2A·H2B 从 RNA 聚合酶前面的核小体上分离，然后，又帮助将其添加到酶后面重新组装的核小体上。完成这一过程还需其他因子的参与。FACT 在其他核小体可能被替代的反应中也发挥作用，包括 DNA

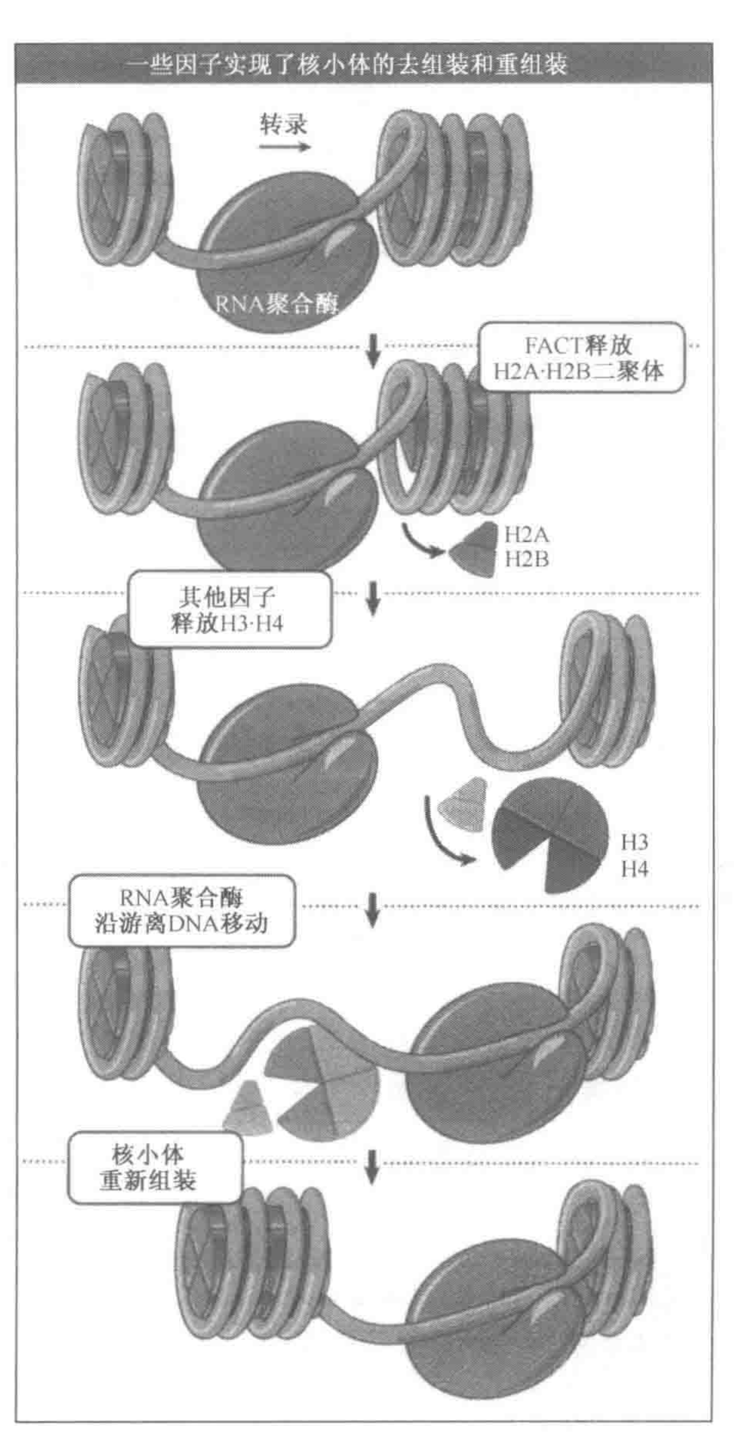


图 6.63 组蛋白八聚体在转录之前去组装以移开核小体，而在转录后它们又重新形成。H2A·H2B 二聚体的释放可能起始了去组装过程。

复制和修复。

维持转录区域内染色质的完整性还需要其他因子，可能是因为它们也涉及核小体的去组装和重新组装，但是我们还没有有关其功能的详细信息。

6.27 DNA 酶高度敏感位点改变染色质的结构

关键概念

- 高度敏感位点被发现位于表达基因的启动子区。
- 转录因子的结合替换了组蛋白八聚体，使高度敏感位点得以产生。

除发生在激活或潜在激活区域的改变之外，结构的改变还发生在与转录起始或与 DNA 特定结构特征相关联的特定位点。这些改变首先是通过低浓度 DNase Ⅰ消化的效果而检测出的。

当染色质用 DNase Ⅰ消化时，首当其冲的就是在二倍体特定的高度敏感位点发生断裂。因为对 DNase Ⅰ的敏感性反映了染色质 DNA 的可利用性，我们用这些位点代表染色质的相应区域——其中 DNA 显著地暴露，因为它不通过普通的核小体结构被组织起来。一种典型的高度敏感位点对酶的敏感性比主体染色质高 100 倍。这些位点对其他核酸酶和化学介质也是高度敏感的。

高度敏感位点的产生是通过(组织特异性的)染色质结构实现的。它们的定位是通过间接末端标记技术检测的(我们在前面核小体定位的章节中介绍过)。这一技术的应用概括如图 6.64。在这种情况下，DNase Ⅰ切割高度敏感位点被用于产生一个片段的末端，并且从其由限制酶切产生片段的另一末端测定其距离。

许多高度敏感位点与基因表达相关，每一个活性基因的启动子区有一个位点，或者有时有多个位点。大多数高度敏感位点只在相关基因被表达的细胞的染色质中被发现，而基因失活时则不会发生。5′高度敏感位点出现在转录开始之前，包含在高度敏感位点的 DNA 序列是基因表达必需的，如突变分析所见到的。

在 SV40 的微小染色体中，有一种被很好地进行过特征分析的独特的核酸酶敏感区域。在其复制起点附近，有一个短片段(恰好在晚期转录单位启动子的上游区域)更容易被 DNase Ⅰ、微球菌核酸酶和其他核酸酶(包括限制性酶)切割。

通过电子显微镜观察，可以分析 SV40 微小染色体的状态。在多达 20%的样品中，可在核小体的组织区发现一个“缺口”(gap)，如图 6.65。这一缺口是长约 120nm 的区域(约 350bp)，两面均有核小体围绕。这种可见的缺口与核酸酶敏感区域相一致。这直接表明，对核酸酶敏感性的增加与核小体的排除是相关联的。

高度敏感位点并不一定对核酸酶有均一的敏感性。图 6.66 为两个高度敏感位点的示意图。

在 SV40 的大约 300bp 的缺口中，有两个 DNase Ⅰ高度敏感位点和一个“被保护的”区域。据推测，被保护的区域可能反映了(非组)蛋白与 DNA 之间的结合。这一缺口同对于启动子功能很必要的 DNA 序列元件相关联。

在 β-球蛋白启动子区的高度敏感位点易于被一些酶消化，包括 DNase Ⅰ、DNase Ⅱ

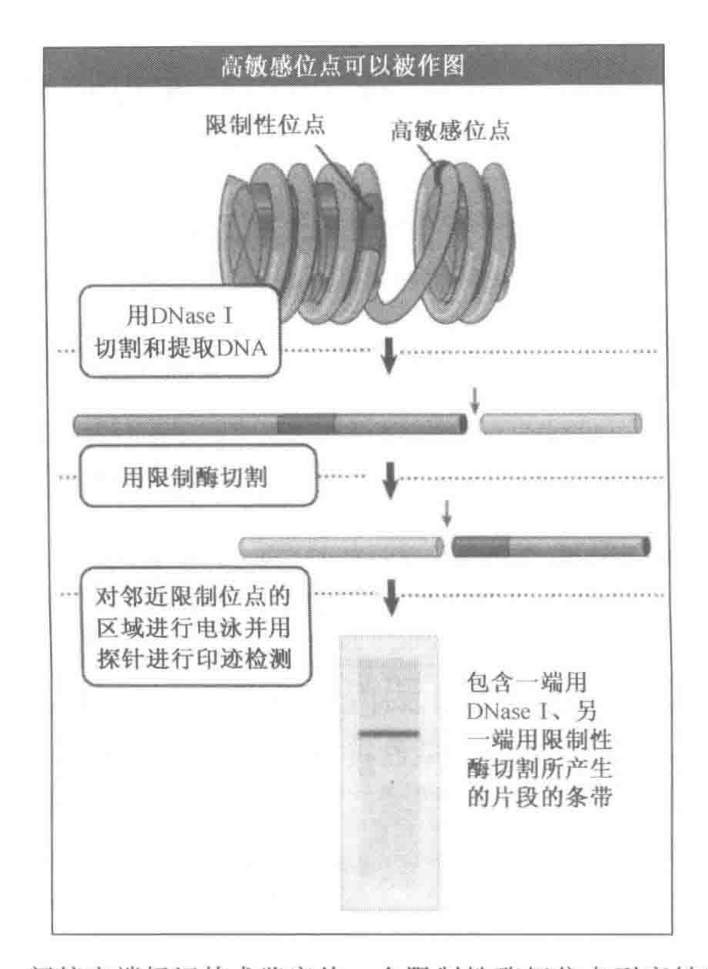


图 6.64 间接末端标记技术鉴定从一个限制性酶切位点到高敏感位点的距离。DNase Ⅰ特定酶切位点的存在可以产生独立的片段，指示了从一个限制性酶切位点到 DNase Ⅰ高敏感位点的距离。

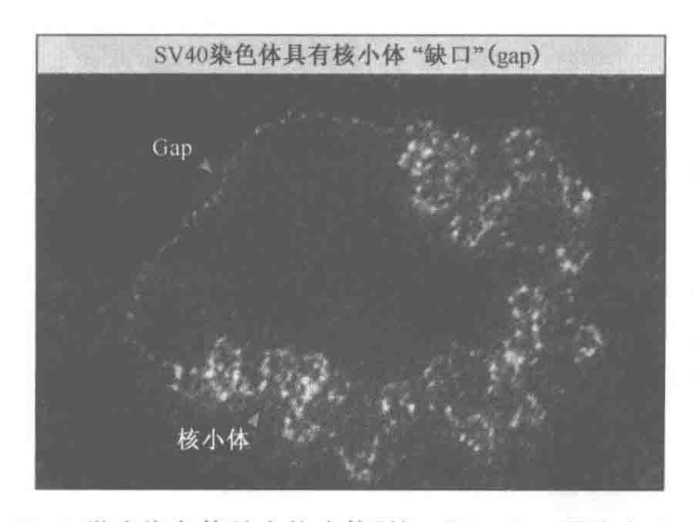


图 6.65 SV40 微小染色体具有核小体"缺口"(gap)。照片由 Pasteur 研究所的 Moshe Yaniv 惠赠。

和微球菌核酸酶。微球菌核酸酶倾向于切割同一通用区域中稍有不同的切割位点。所以，当基因可转录时，从－70 延伸到－270 的区域优先成为酶的可抵达部位。

高度敏感位点的结构是如何的呢？它对酶的优先可抵达性说明它不被组蛋白八聚体

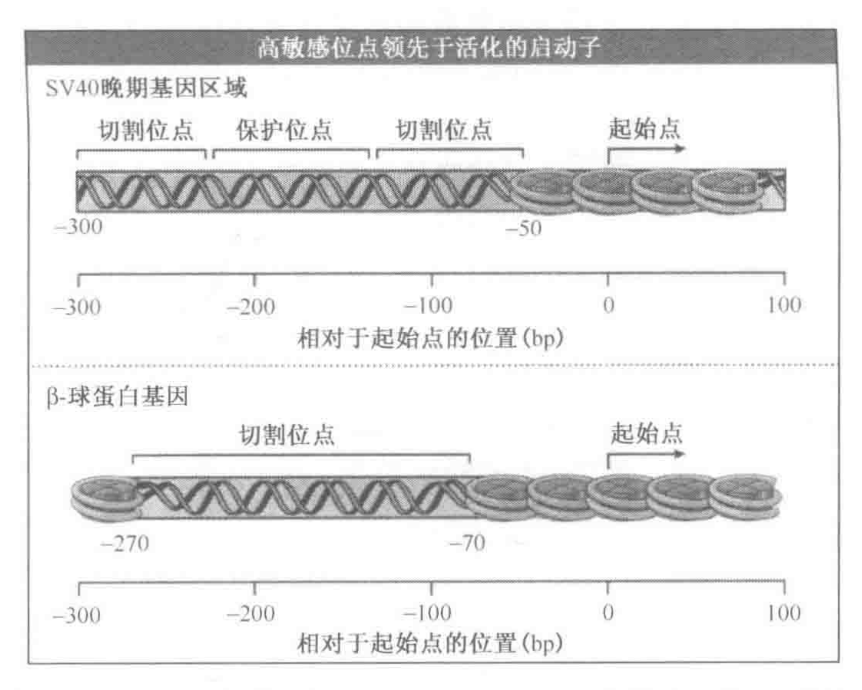


图 6.66 SV40 的“缺口”(gap)包含了 DNA 的高敏感区域、敏感区域和受保护区域。鸡的 β-球蛋白基因包括一个对若干种核酸酶敏感的区域。

保护,但是这并不意味这一区域没有蛋白质结合。游离的 DNA 区域可能易受攻击,容易被破坏;而在任何情况下,这一区域如何能将核小体排除在外?我们假设,高度敏感位点是由于与特定的调节蛋白结合而将核小体排除的。事实上,此类蛋白质的结合可能是高度敏感位点内被保护区域存在的基础。

产生高度敏感位点的蛋白质可能是多种类型的调节因子,因为人们发现高度敏感位点与启动子、其他转录调节元件、复制起点、着丝粒和其他具有重要结构意义的位点有联系。在某些情况下,它们与更广泛的染色质结构的组织相关。高度敏感位点可能为一系列被定位的核小体提供了一个边界。与转录相关的高度敏感位点可能由转录因子产生。当这些转录因子与启动子结合作为此过程(启动转录——译者注)中的一部分成分时,就使得 RNA 聚合酶更能接近(见MBOI:6-0004)。

6.28 染色质重塑是一个活跃过程

关键概念

- 染色质结构通过重塑复合体而改变,其能量由 ATP 水解提供。
- SWI/SNF、RSC 和 NURF 复合体都非常巨大;它们有一些通用亚基。
- 重塑复合体自身并非对任何特定的目标具有特异性,但一定需要被一个转录装置召集。
- 重塑复合体被序列特异的激活因子招募到启动子上。
- 重塑复合体一旦处于结合态,其中的因子就可能被释放。

细胞基因组被组装成核小体,但转录的起始却通常因启动子区域包装成核小体而被抑制。从这一意义上,组蛋白是作为广泛的转录抑制因子(一个相当老的观点)发挥功能的。基因的激活需要改变染色质的状态:关键问题是转录装置如何与启动子 DNA 接近。

一个表达的基因同时是否依赖于染色质的自身局部结构(在启动子位置)和周围的结构域？这是个有意义的问题。相应的，染色质结构或者能够被个别的激活事件，或者被影响广泛的染色体区域变化所调控。最局部化的事件涉及一个特定的目标基因，其中核小体结构和组织的改变发生在紧邻启动子的区域。更加普遍的变化可能会影响到大到整个染色体那样的广泛区域。

影响广泛区域的改变控制着一个基因被表达的潜在能力。“沉默”(silencing)这一名词被用于说明在局部染色质区域的基因活性被抑制的情况。术语“异染色质”(heterochromatin)用于描述用显微镜可观察到的足够大的、在物理学意义上具有更紧密结构的染色体区域。两种类型的改变具有相同的基础：额外的蛋白质结合于染色质，并直接或间接地阻碍了转录因子和 RNA 聚合酶与活化的启动子区域结合。

个别启动子区域的改变控制着特定基因的转录是否能起始。这些改变可能是激活，也可能是抑制。

局部的染色质结构是控制基因表达的完整部分。基因的存在可能以两个结构条件中的任何一个为基础。只有在被表达的细胞中基因才表现为“激活的”状态。转录之前的结构变化说明基因是可转录的。这说明，获得“活性的”结构一定是基因表达的第一步。活性基因位于对核酸酶敏感的常染色质的结构域(见 6.23 结构域的含义是包含转录活性基因的区域)。启动子区域的高度敏感位点是在基因激活之前产生的(见 6.27DNA 酶高度敏感位点改变染色质的结构)。

在转录起始和染色质结构变化之间有紧密而持续的联系。一些基因转录的激活因子直接修饰组蛋白，尤其是组蛋白的乙酰化与基因的激活相关联。相反的，一些转录因子的抑制因子通过脱乙酰化发生作用。所以启动子临近区域组蛋白结构的可逆性改变参与了基因表达的控制。这可能是基因维持其活性或非活性状态的机制的一部分。

染色质局部区域维持在非活性状态(沉默)的机制与局部启动子抑制的途径有关。异染色质形成涉及的蛋白质通过组蛋白作用于染色质，并且组蛋白的修饰可能是这一相互作用的重要特征。

染色质结构中通常的诱导性变化过程称做染色质重塑(chromatin remodeling)。这其中包括依赖于能量输入的替换组蛋白机制；许多蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA 相互作用都需要被中断，以使组蛋白从染色质中释放出来。

没有无本之木，破坏这些相互作用必然是需要有能量提供的。图 6.67 举例说明了一个因子通过水解 ATP 为重塑提供动力的原则。当组蛋白八聚体从 DNA 上释放时，其他蛋白质(此例中指转录因子和 RNA 聚合酶)就能够结合。

图 6.68 总结了可以以体外实验进行特征分析的染色质重塑变化类型：

• 组蛋白八聚体可以沿 DNA 滑动，使核酸和蛋白质间的关系发生改变。这转变了核小体表面特定序列的定位。

• 组蛋白八聚体间的空间可能发生改变，同时也产生了特定序列的位置相对于蛋白质发生变化的结果。

• 并且最广泛的变化是一个或多个八聚体可能从 DNA 上被完全替换，从而产生一个没有核小体的缺口。

染色质重塑最常见的功能是改变一个要被转录的基因的启动子区域核小体的组织。

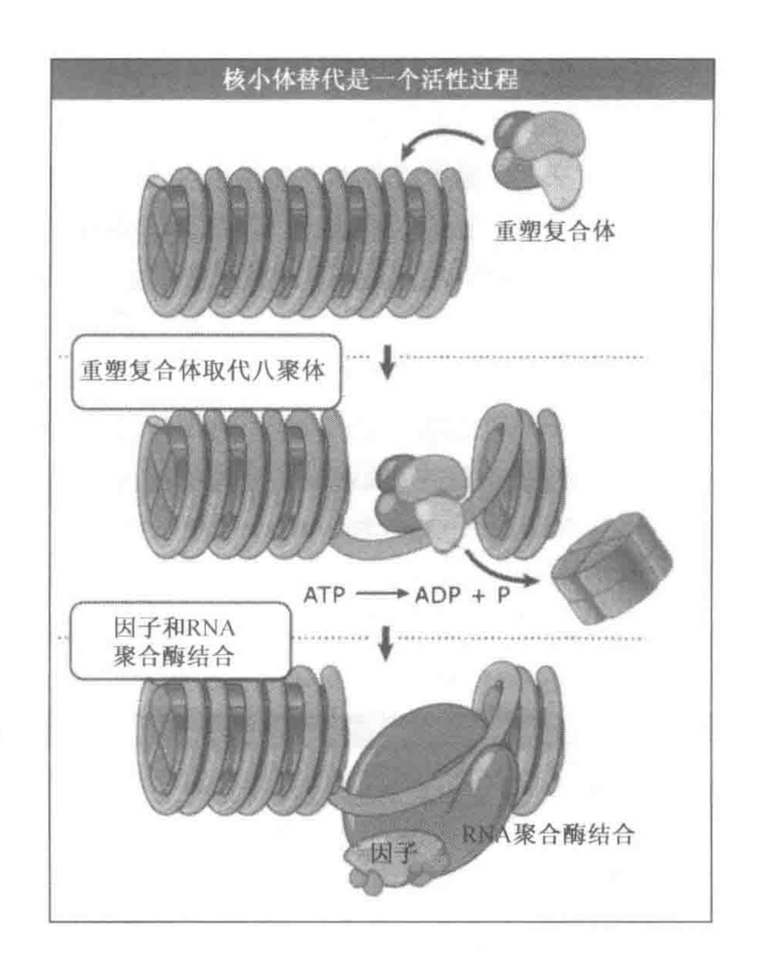


图 6.67　染色质转录的动力学模型依赖于一些因子，它们通过利用 ATP 水解提供的能量从特殊的 DNA 序列中替换核小体。

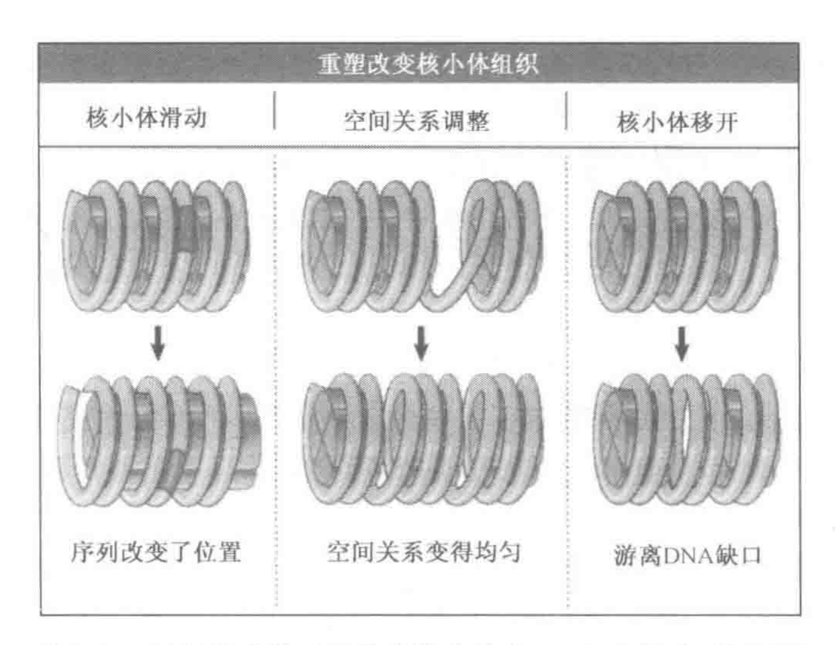


图 6.68　重塑核小体可以导致核小体在 DNA 上滑动、从 DNA 上移开核小体，或者重新组织核小体之间的空间关系。

这需要使得转录装置能够获得条件与启动子区接近。然而，重塑也是其他染色质操作的

必要条件,包括损伤 DNA 的修复反应。

重塑大多是以替换一个或多个组蛋白八聚体的形式进行的。这能通过微球菌核酸酶酶解产物梯度电泳带谱的改变来证实,其中针对核酸酶裂解的保护机制丢失。这常导致对 DNase Ⅰ敏感的切割位点的产生(见 6.27DNA 酶高度敏感位点改变染色质的结构)。有时很少有巨大的改变,例如涉及一个核小体转动定位的改变;这可以通过失去 DNase Ⅰ的 10 碱基的消化片段来检测。所以染色质结构的改变可能从转变核小体的位置到使其移动到一起的过程扩展而来。

染色质重塑是由巨大的重塑复合体承担的,它们通过利用 ATP 的水解为重塑提供能量。重塑复合体的中心是一个 ATP 酶亚基。重塑复合体通常按照 ATP 酶亚基的类型来分类——具有相关的 ATP 酶亚基的被认为属于同一个家族(通常一些其他的亚基也是共同的)。图 6.69 直接保留了原有的名称。两个主要类型的复合体是 SWI/SNF 和 ISW(ISW 代表 SWI 的类似物)。酵母菌有每种类型的两个复合体,各种类型的复合体也存在于蝇类和人类中,每种类型的复合体可能参与不同范围的重塑活动。

重塑复合体有若干种类型

复合体的类型	SWI/SNF	ISW	其他
酵母	SWI/SNF RSC	ISW1 ISW2	
果蝇	dSWI/SNF (Brahma)	NURF CHRAC ACF	
人类	hSWI/SNF	RSF hACF/WCFR hCHRAC	NuRD
青蛙			Mi-2

图 6.69 重塑复合体可以按照它们的 ATP 酶亚基类型来分类。

SWI/SNF 是被鉴定的第一个重塑复合体。它的名字反映了它的许多亚基是由最初在啤酒酵母(*S. cerevisiae*)被确定出 *SWI* 或 *SNF* 突变的基因所编码的。这些突变也展示了编码染色质组分的基因突变体的遗传相互作用,尤其是编码非组蛋白的基因 *SNI1* 和编码组蛋白 H3 的 *SIN2* 基因。*SWI* 和 *SNF* 基因是多种单个基因座位表达所必需的(大约 120 个或 20%的啤酒酵母基因受到影响)。这些基因座位的表达可能需要 SWI/SNF 复合体在其启动子处重塑其染色质。

SWI/SNF 在体外能起催化作用,并且每个酵母细胞只有大约 150 个复合体。所有编码 SWI/SNF 亚基的基因都并非必不可少,这暗示了酵母菌一定还有其他的染色质重塑方式。比较而言,RSC 复合体是更加充裕的复合体,并且也是必需的,它能作用于大约 700 个目标基因座位。

在体外实验中,SWI/SNF 复合体能够重塑染色质而不使其全部失去组蛋白,或者能够替换组蛋白八聚体。所有类型的反应可能通过同样的中介物,其中目标核小体的结构被改变,导致起始 DNA 上的(重塑)核小体重新形成或是将组蛋白八聚体替换到不同的 DNA 分子。SWI/SNF 复合体改变了核小体的目标位点对 DNase Ⅰ的敏感性,并且诱导了在它从核小体上释放后持续的蛋白质-DNA 结合关系的改变。SWI2 亚基是 SWI/SNF 为重塑提供能量的 ATP 酶。

在 DNA 和组蛋白八聚体间有许多相互联系——14 个是在晶体结构中被确定的。所有这些相互联系必须被破坏才能使八聚体被释放或者移动到一个新的位置。这是如何完成的呢？一些显而易见的机制可以被排除，因为我们知道重塑过程中不产生单链 DNA（并且没有与复合体相关的旋转酶活性）。现在的观点认为，SWI 和 ISW 类型中的重塑复合体利用 ATP 水解供能去旋转核小体表面的 DNA。间接证据表明，这产生了机械力允许一个小区域的 DNA 从表面被释放并且重新定位。

由重塑复合体催化的一个重要反应涉及核小体的滑动。人们第一次观察到，ISW 家族的作用是影响核小体定位而不是替换八聚体。这是通过一个滑动反应完成，反应中八聚体沿着 DNA 移动。如果组蛋白 H4 的 N 端尾被去掉，则滑动就被抑制，但我们并不确切地明白此种关系中尾部如何作用。SWI/SNF 复合体有相同的能力，此反应被 DNA 中的一个障碍物的引入所抑制。这说明有一个滑动反应参与其中。在此反应中，组蛋白八聚体沿着 DNA 持续地或多或少地移动，而并不失去与 DNA 的联系。

有关 SWI/SNF 复合体作用的一个难题是它的绝对大小。它有 11 个亚基，综合相对分子质量大约为 2×10^6。它使 RNA 聚合酶和核小体变小，使得人们很难理解所有这些组分如何能与保留在核小体表面的 DNA 相互作用。然而，我们能够发现，一个有完全活性的转录复合体（称做 RNA 聚合酶Ⅱ全酶）含有 RNA 聚合酶本身、除 TBP 和 TFIIA 以外的所有 TFII 因子，和与聚合酶的 CTD 尾结合的 SWI/SNF 复合体。事实上，这些 SWI/SNF 复合体可能存在于全酶的制备物中。这说明染色质的重塑和启动子的识别是由同一个复合体以协同的方式承担的。

重塑复合体是如何以染色质的特定位点为目标组织起来的？它们本身并不包含能够结合特异 DNA 序列的亚基。这暗示了如图 6.70 所示的模型，其中它们被激活因子或（有时）抑制因子招募。这一过程是由“碰撞逃离”（hit and run）机制完成的。此机制中，激活因子或抑制因子在重塑复合体结合后被释放。

染色质重塑通过使组蛋白状态发生改变来完成，尤其是通过修饰 H3 和 H4 的 N 端尾部。组蛋白尾由 N 端的 20 个氨基酸组成并且从 DNA 螺线圈之间的核小体中延伸出来（参见图 6.44）。它们可能通过甲基化、乙酰化或磷酸化在许多位点被修饰。组蛋白的修饰为非组蛋白的附着创造了结合位点，并随后改变了染色质的性质。

作为修饰目标的核小体的范围是变化的。修饰可以是局部事件，例如局限在核小体启动子区；它也可以是一个广谱事件，例如扩展至整个染色体。图 6.71 说明了一种普遍的相关性——乙酰化与活性染色质相关，而甲基化与非活性染色质相关。然而，这不是一个简单的规则。除了特定修饰作用的联合效应外，被修饰的特定位点可能是很重要的，所以必然有一些例外，例如发现在活性染色质的某位置有组蛋白甲基化。

许多修饰酶在特定的组蛋白中有各自的目标位点这一事实指示了修饰的特异性。图 6.72 总结了一些修饰的影响。大多数修饰位点易于发生同一类型的修饰。在某些情况下，一个位点的修饰可能激活或者抑制其他位点的修饰。信号联合可能被用于定义染色质类型这一观点，有时被称做“组蛋白编码”（histone code）。

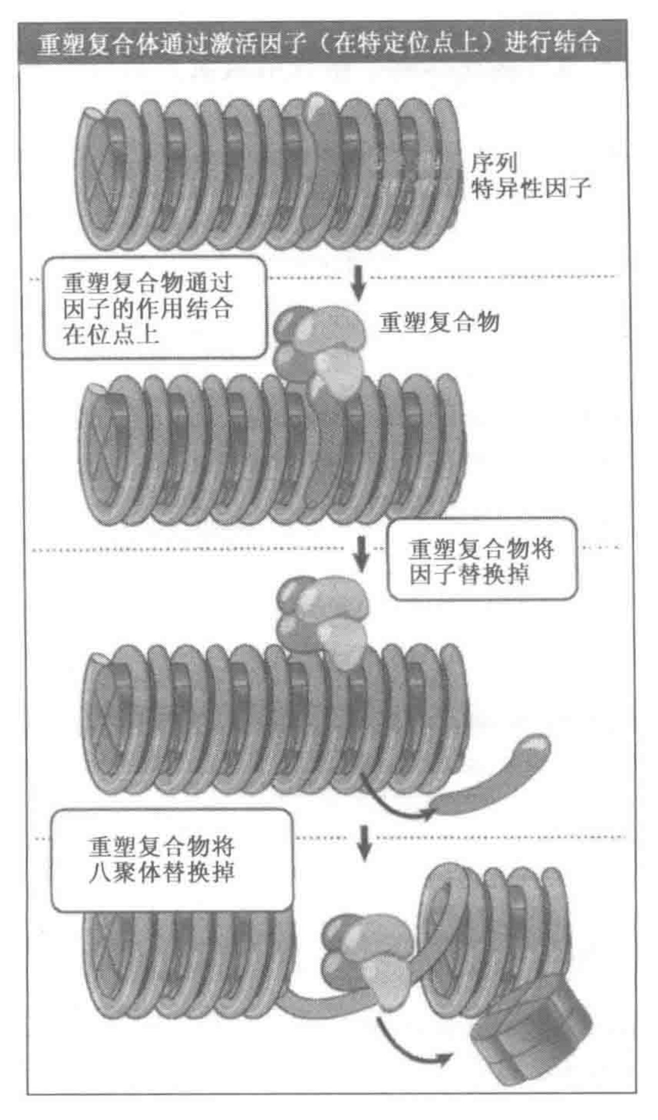


图 6.70　一个重塑复合体通过激活因子(或抑制因子)结合到染色质上。

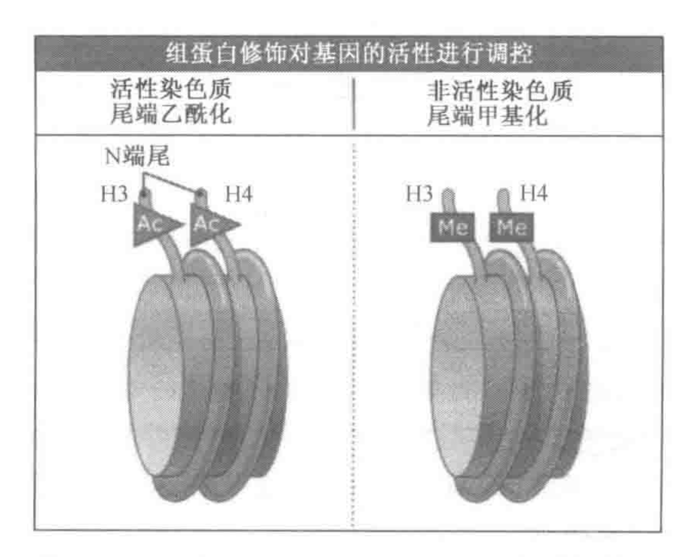


图 6.71　H3 和 H4 的乙酰化与活性染色质相联系，而其乙酰化与非活性染色质相联系。

组蛋白修饰影响染色质的结构和功能			
组蛋白	位点	修饰	功能
H3	Lys-4	甲基化	
	Lys-9	甲基化	染色质凝集;DNA 甲基化的需要
		乙酰化	
	Ser-10	磷酸化	
	Lys-14	乙酰化	阻止 Lys-9 的甲基化
	Lys-79	甲基化	端粒酶剪切
H4	Arg-3	甲基化	
	Lys-5	乙酰化	
	Lys-12	乙酰化	
	Lys-16	乙酰化	核小体组装;果蝇 X 染色体激活

图 6.72 组蛋白的大多数修饰位点具有单一的、特定的修饰类型,但是有的位点可以有多个修饰类型。单个功能可以与某些修饰相联系。

6.29 组蛋白乙酰化与遗传活性相关

关键概念

- 组蛋白乙酰化短暂地发生在复制时。
- 组蛋白乙酰化与基因表达活性相关。
- 脱乙酰化的染色质可能有更加紧密的结构。
- 转录激活因子与巨大复合体中的组蛋白乙酰化酶相关联。
- 重塑复合体可以招募乙酰化的复合体。
- 组蛋白乙酰化酶在目标特异性上是可变的。
- 乙酰化能够对转录施以数量或质量上的影响。
- 脱乙酰化与基因活性的抑制有关。
- 脱乙酰化存在于有抑制因子活性的复合体中。
- 组蛋白的乙酰化可能是维持复合体活性状态的事件。

所有核心组蛋白都可能被乙酰化。乙酰化的主要目标是组蛋白 H3 和 H4 的 N 端赖氨酸。

乙酰化发生在两种不同的情况下:一是 DNA 复制期间;二是基因被激活时。

当染色体被复制的时候,在细胞周期的 S 期,组蛋白被短暂地乙酰化。图 6.73 说明这种乙酰化发生在组蛋白整合进核小体之前。我们知道,组蛋白 H3 和 H4 是在 $H3_2 \cdot H4_2$ 相互结合在四聚体内这一阶段被乙酰化的,随后,四聚体被整合进核小体。很快,乙酰基团也被去除。

在复制过程中组蛋白 H3 和 H4 乙酰化均被阻止则引起酵母失去生存能力,这一事实说明了乙酰化的重要性。这两个组蛋白作为反应底物是绰绰有余的,因为只要它们中的任何一个在 S 期能发生乙酰化,酵母菌就完全能够很好地成活。乙酰化作用可能扮演

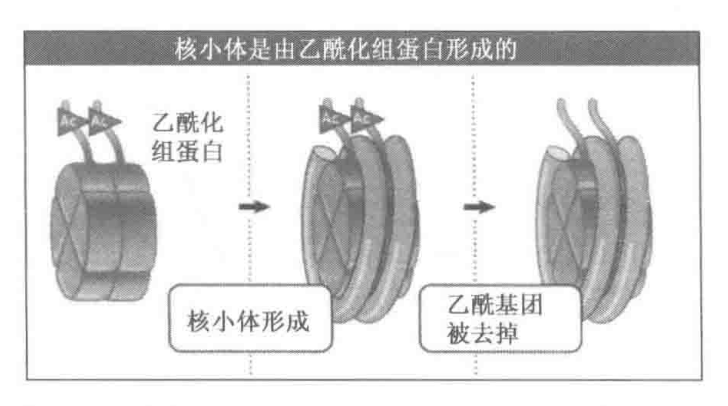


图 6.73 复制时的乙酰化在组蛋白掺入核小体前发生在组蛋白上。

着两个角色:它能使组蛋白被将其整合入核小体的因子识别,或者是新核小体的组装或结构所需要的机制。

已知与染色质组装有关的因子不能区分乙酰化和脱乙酰化的组蛋白,这表明修饰更可能是后续相互作用所需要的。很久以来,人们就认为乙酰化可能有助于控制蛋白质-蛋白质的相互作用,就像组蛋白整合进入核小体时所发生的蛋白质互作那样。能够证明此功能的证据是酵母的 SAS 组蛋白乙酰化酶复合体结合到位于复制叉处的染色质组装复合体上,其中复制叉处组蛋白 H4 的赖氨酸-16 被它乙酰化。这可能是复制后建立组蛋白乙酰化模式系统的一部分。

在 S 期以外,染色质的组蛋白乙酰化通常与基因表达状态相关。其相关性被首先注意到,因为组蛋白乙酰化在一个包含活性基因的结构域中是增加的,并且乙酰化的染色质对 DNase Ⅰ,可能也对微球菌核酸酶有更大的敏感性。图 6.74 表明这与核小体中组蛋白尾的乙酰化有关。现在我们知道以上情况的广泛发生是由于激活基因启动子邻近区域核小体的乙酰化。

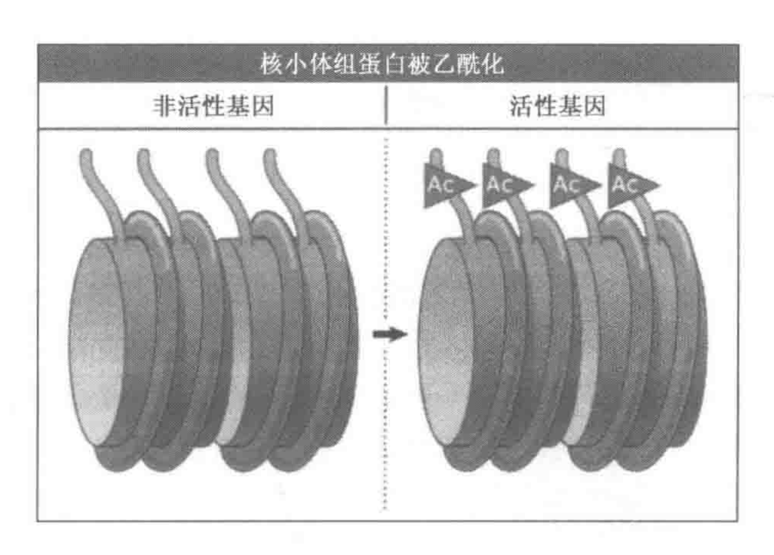


图 6.74 与基因活化相伴随的乙酰化发生通过对核小体中组蛋白的直接修饰得以实现。

除了单个启动子区域的事件外,乙酰化的大规模改变发生在性染色体上。这是 X 染色体上活性基因发生转变来对一种个体的细胞中有两条 X 染色体而在另一种个体的细

胞中(除Y染色体外)只有一条所带来的不平衡进行补偿的机制中的一部分(见6.32X染色体经历着全面的改变)。雌性哺乳动物中失活X染色体的H4是低乙酰化的,而在雄性果蝇中的超活性X染色体上则发生H4乙酰化增加,这说明乙酰基团的存在可能是低凝缩程度和活性结构的前提。在雄性果蝇中,X染色体在组蛋白H4的^{16}Lys处特异性地乙酰化。在这一过程中发挥功能的组分是一个被称做MOF的酶,它被招募到染色体上成为一个大的蛋白质复合体的一部分。"剂量补偿"复合体发挥功能引起了X染色体的一般改变而使其能够高度表达,而乙酰化的增加只是其活性表现的一个方面。

乙酰化是可逆的。反应的每一个方向都是由一个特殊类型的酶所催化的。能够乙酰化组蛋白的酶称做组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase)或者HAT;乙酰基团被组蛋白脱乙酰化酶或HDAC移除。HAT有两种类型:A类酶作用于染色质组蛋白并与转录控制有关;B类酶作用于胞浆中新合成的组蛋白并与核小体的组装有关。

一个A类HAT作为一个巨大复合体的一部分存在,这是组蛋白乙酰化的一般特征。图6.75展示了其行为的一个简化模型。典型的复合体包含决定DNA上结合位点的一个或多个目标亚基,决定了HAT的靶子。复合体还包含效应因子(effector)亚基,对染色质结构产生影响或直接作用于转录。可能至少效应因子中的一部分需要通过乙酰化事件来发生作用。脱乙酰化由HDAC催化,可能以相似的方式发生作用。

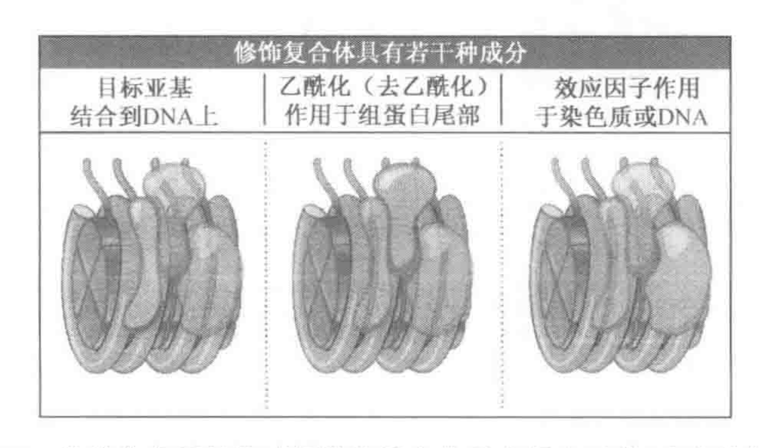


图6.75 修饰染色质结构或活性的复合体具有靶向亚基(决定其作用位点)、HAT或HDAC酶(对组蛋白进行乙酰化或去乙酰化)和效应亚基(对染色质或DNA产生其他作用)。

乙酰化的效应是定性的还是定量的呢?一种可能是一定数量的乙酰基团是产生效应的条件,并且发生乙酰化的准确位置是大不相关的;另一种可能是单个的乙酰化事件都有其特殊效果。我们可以解释在每种情况下包含多种HAT活性的复合体的存在:如果单个酶具有不同特点,我们就可能需要多种活性的作用成分——或者是为了去对足够数量的不同位置进行乙酰化,或者是因为转录的不同效应必须要通过个性化事件来实现。在复制时,至少对于组蛋白H4来说,3个位点中只要任何2个发生了乙酰化,便有了足够的效用,此情况是对数量模型的支持。在染色质结构的改变对转录产生影响的地方,特定位置的乙酰化非常重要(见6.31异染色质的性质依赖于与组蛋白的相互作用)。

就像转录激活与乙酰化酶相关联那样,转录失活也与去乙酰化酶相关。这对于单个基因和异染色质都是适用的。特定启动子的抑制作用可能由具有去乙酰化酶活性并作用于邻近启动子的局部区域的复合体来完成。在组成型异染色质(典型的包括着丝粒和端

粒区域)和功能型异染色质(在一些细胞中失活却可能在另一些细胞中有活性的区域)中,都不发生染色质组蛋白的乙酰化。在典型情况下,组蛋白 H3 和 H4 的 N 端尾在异染色质区域不发生乙酰化。

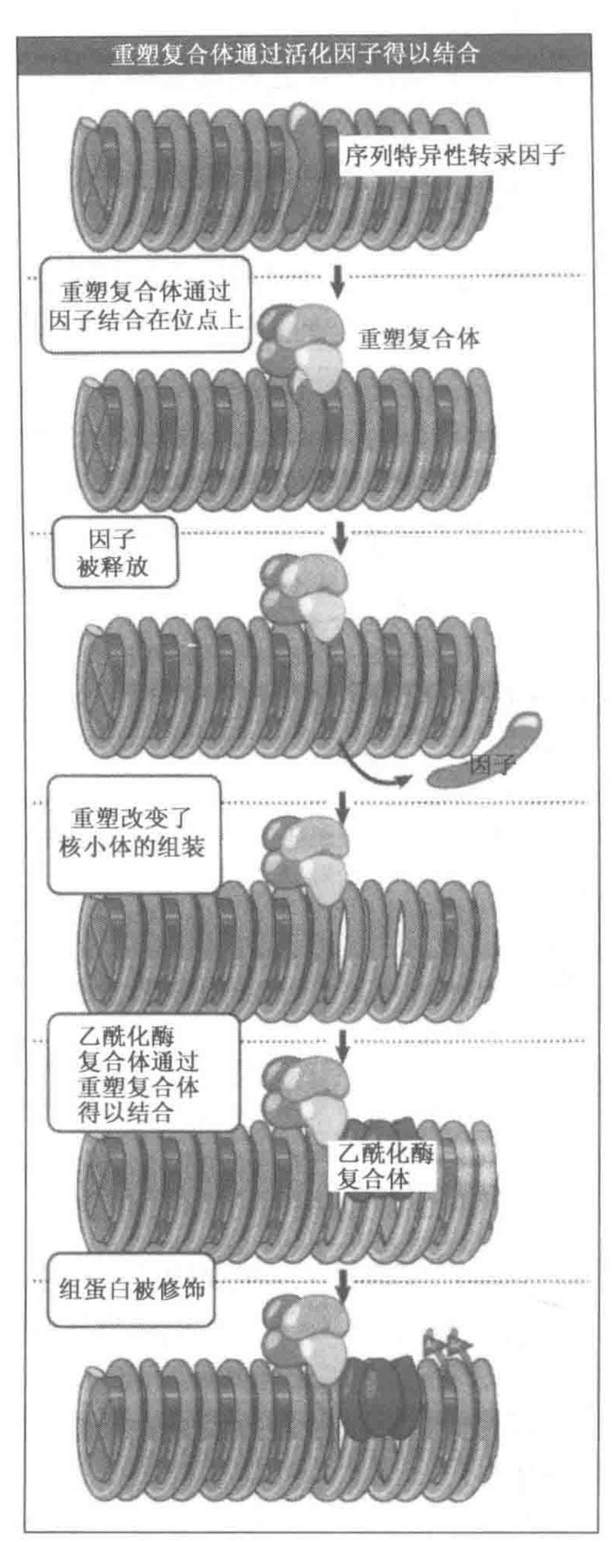


图 6.76 启动子的活化包括位点特异性活化因子的结合、一个重组复合体的招募和作用以及一个乙酰化复合体的招募和作用。

乙酰化酶(或去乙酰化酶)是如何被招募到它们特定的目标位点上的呢?就像我们前面讨论过的重塑复合体那样,此过程很可能是间接的。一个序列特异的激活因子(或抑制因子)可能与乙酰化酶(或脱乙酰化酶)复合体相互作用而将其招募到启动子上。

在重塑复合体和组蛋白修饰复合体间也可能有直接的相互作用。与 SWI/SNF 重塑复合体的结合可能会随即导致与乙酰化酶复合体的结合。组蛋白乙酰化可能因此事实上稳定了与 SWI/SNF 复合体的结合,使得位于启动子区域的组分的改变共同加强。

我们将所有位于启动子处的这些事件联系起来得到一系列总结,如图 6.76。起始事件是序列特异性组分的结合(能够在染色质"上下文"中找到其目标 DNA 序列)。这一步骤招募一个重塑复合体,其变化发生在核小体的结构上。乙酰化复合体结合,然后目标组蛋白的乙酰化提供了基因座位已经被激活的共同标志。

DNA 的修饰也发生在启动子处。CpG 二聚体处胞嘧啶的甲基化与基因失活有关,作为甲基化目标的 DNA 识别基础,还没有很好地确定依据。

很清楚,启动子区染色质的重塑需要乙酰化在内的影响核小体的许多变化。但是,基因内发生什么样的变化能使 RNA 聚合酶穿过呢?我们知道 RNA 聚合酶能在体外以与体内相似的速率,以仅以游离方式存在的 DNA 做模板转录 DNA(约 25 个核苷酸/s)。有几种蛋白质以具有改进体内 RNA 聚合酶转录染色质的速度的能力为特征。其共同特点是它们都作用于染色质。它们作用的通用模型是它们与 RNA 聚合酶结合并且沿着模板运动,通过作用于组蛋白对核小体的结构进行修饰。组蛋白乙酰化酶也是这些因子当中的一员。一种可能性是第一个转录一个基因的 RNA 聚合酶是先导性聚合酶,它携带

有若干因子，改变转录单位结构，以便使后续的聚合酶更容易进入。

6.30 异染色质由一个成核事件产生

关键概念

- 异染色质是在特定序列处从成核作用开始产生的，并且沿着染色质纤维产生了失活的结构。
- 异染色质区域内的基因没有活性。
- 因为失活区域的长度因细胞不同而变化，邻近区域的基因失活引起位置效应的多样变化。
- 相似的扩展效应也发生在端粒和酵母交配型的沉默盒(silent cassette)上。

一个细胞间期的核既包含常染色质也包含异染色质。异染色质的凝缩状态接近于有丝分裂的染色体。异染色质是惰性的，它在间期也保持凝缩状态，其转录受到抑制，在S期复制得晚，并可能定位于核周边。着丝粒异染色质典型地由卫星DNA组成，然而，异染色质的形成并不是严格地由序列决定的。当一个基因(不管是通过染色体易位还是转染和整合)发生转移的时候，它会进入异染色质的邻近位置，到达新位置的结果可能使其失活，这就暗示它也变成了异染色质性质的了。

这样的失活是表观遗传效应(epigenetic effect)的结果(见MBIO:6-0005)。在动物中的单个细胞之间，这种效应有差异，造成了位置效应花斑(position effect variegation, PEV)现象，其中遗传上等同的细胞具有不同的表型。这一现象的特征在果蝇中已经被很好地认识。图6.77(见图版)给出了果蝇眼部位置效应花斑的例子，其中果蝇眼部中一些区域缺乏颜色，而另一些区域则显红色，因为在一些细胞中"白色"基因位于异染色质附近而被灭活，而在其他细胞中它保持着活性。

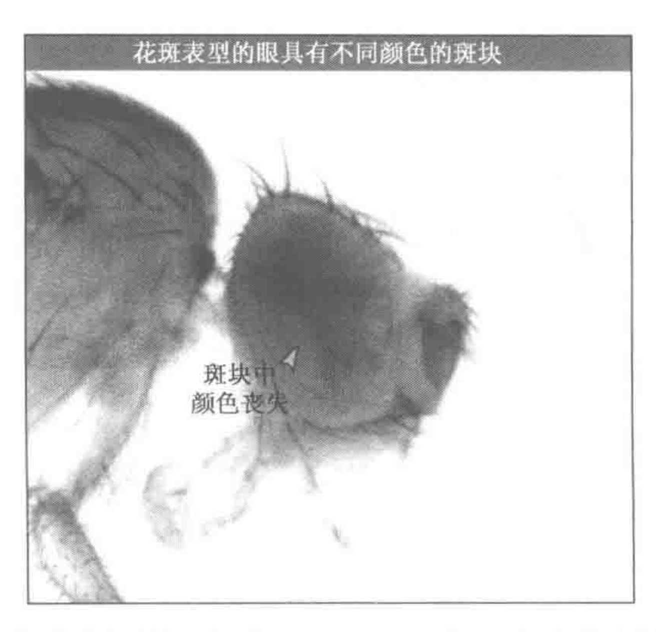


图6.77 当"白色"基因整合到异染色质邻近位置时，在眼睛颜色上就表现为位置效应花斑现象。在"白色"基因失活的细胞中产生白眼斑块，而在"白色"基因有活性的细胞中产生红眼斑块。整合的基因与异染色质的邻近程度决定了位置效应花斑的严重程度。照片由Fred Hutchinson癌症研究中心的Steven Henikoff惠赠。

这一效应的解释如图 6.78 所示。失活过程从异染色质蔓延到不同距离的邻近区域。在一些细胞中它扩展得足够远而使一个邻近的基因失活,但是其他细胞中则不产生这种影响。这发生在胚胎发育的特定时间点,并且那一时间点之后,基因的状态被所有的子代细胞继承下来。细胞来自于一个祖先细胞,其中相关基因是失活形式的斑块,对应于功能丧失型的表现型(以白色基因为例,表现为没有颜色)。

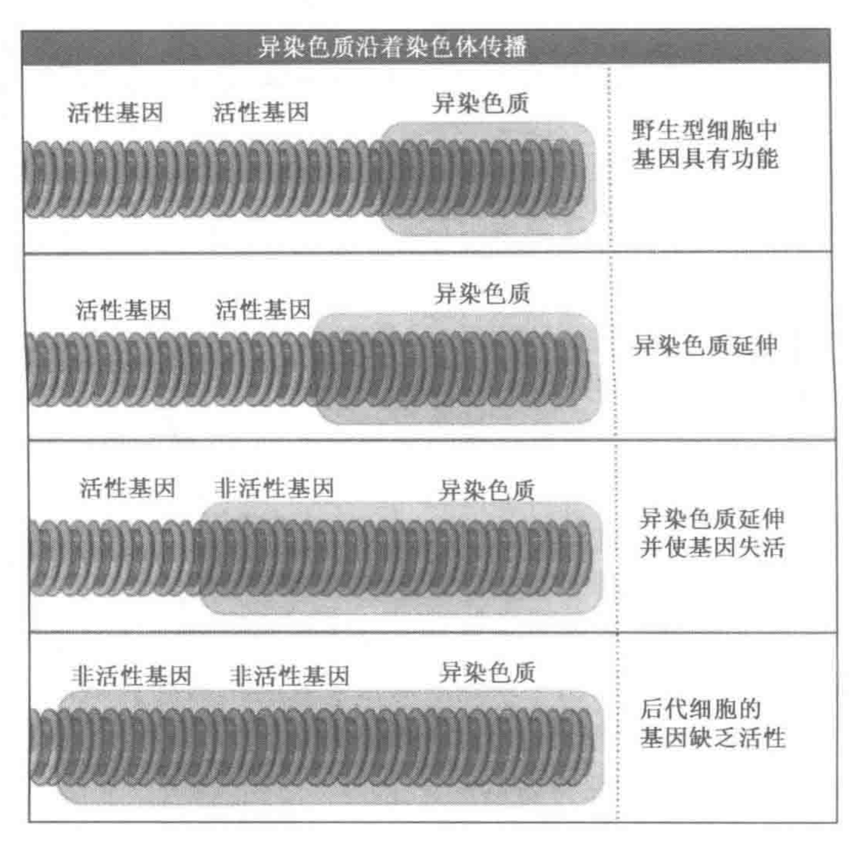


图 6.78　异染色质的延伸使基因失活。基因被灭活的可能性取决于它与异染色质区域的距离。

一个基因越是位于离异染色质较近的位置,其被灭活的可能性就越高。这表明,异染色质的形成可能是一个两步过程:在一个特殊的序列发生成核现象,并且在其后失活结构沿着染色质纤丝传播。失活结构延伸的距离并非精确地确定的,而可能是随机的,受一些参数的影响,比如有限蛋白质组分的量。可能影响扩展过程的一个因素是在这个区域中启动子的失活;一个有活性的启动子可能阻止继续扩展。

基因越接近异染色质越可能失活,因此,在一个较大比例的细胞中它将失活。在这种模型中,一个异染色质区域的界限可能因其中一种所需蛋白质供应的耗竭而终止。

在酵母中的端粒沉默(telomeric silencing)效应类似于果蝇中的位置效应花斑。基因易位到一个端粒位置显示了相同种类的可变的活性丧失。这个结果来自从端粒开始传播的扩展效应。

第二种沉默形式发生在酵母中。酵母交配型(mating type)是通过单个活性座位(*MAT*)的激活确定的,但是基因组中包含两种其他交配型序列(HML 和 HMR)的拷贝,它们保持为一个非活跃的形式。沉默座位 HML 和 HMR 与异染色质共享许多特征,并且在缩小的模型中可能被认为是异染色质的组成性区域。

6.31 异染色质的性质依赖于与组蛋白的相互作用

关键概念

- HP1 是哺乳动物异染色质形成的一个关键蛋白质，通过与甲基化的 H3 组蛋白结合起作用。
- RAP1 通过与特异的靶序列结合来起始酵母菌中的异染色质形成。
- RAP1 的靶序列包括端粒重复序列和位于 HML 和 HMR 上的沉默子。
- RAP1 招募作用于组蛋白 H3 和 H4 的 N 端尾部的 SIR3/SIR4 。

染色质失活的发生通过其他蛋白质附加到核小体纤维上得以实现。失活的起始可能源于多种因素，如染色质固缩导致基因表达所需要的装置不能接近，蛋白质的附件直接阻止了调控位点的入口，或者还有直接抑制转录的蛋白质的作用。

现在已在分子水平上阐明了两个与异染色质化相关的系统的特性：哺乳动物的 HP1 和酵母菌的 SIR 复合体。虽然两个系统中的参与蛋白质在细节上没有相似之处，但是反应的一般性机制是相似的：它们染色质中的接触位点都是组蛋白的 N 端尾。

HP1(异染色质蛋白 1)最初是在用一种针对这个蛋白质的抗体进行多线染色体染色时发现的，它位于异染色质上，在酵母菌 *S. pombe* 中的同源物为 swi6。最初发现的 HP1 蛋白现在称为 HP1α，因为此后又相继发现了 HP1β 和 HP1γ。

HP1 含有一个位于 N 端的染色域(chromo domain)和一个位于 C 端的相邻结构域，称为染色影子域(chromo-shadow domain)(见图 6.80)。HP1 的很多突变都发生在染色域，说明染色域具有极其重要的作用。染色域是由 60 个氨基酸形成的一个一般性功能域。在很多能够活化或者抑制染色质活性的蛋白质中都存在这个功能域，表明染色域代表了参与同染色质靶片段的蛋白质-蛋白质相互作用的功能域。染色域通过识别甲基化组蛋白尾部中的赖氨酸残基介导了蛋白质向异染色质靶位的结合。

作用于组蛋白 H3 Ac-^{14}Lys 的去乙酰酶的突变抑制了^{9}Lys 的甲基化。^{9}Lys 被甲基化的组蛋白 H3 通过染色域与 HP1 结合。如图 6.79 所示的模型揭示了异染色质形成的起始过程。首先，去乙酰酶解除^{14}Lys 上的乙酰化修饰；接着，甲基化酶作用于组蛋白 H3 的尾产生一个可以让 HP1 结合的甲基化信号。图 6.80 利用扩展的反应过程说明了发生于

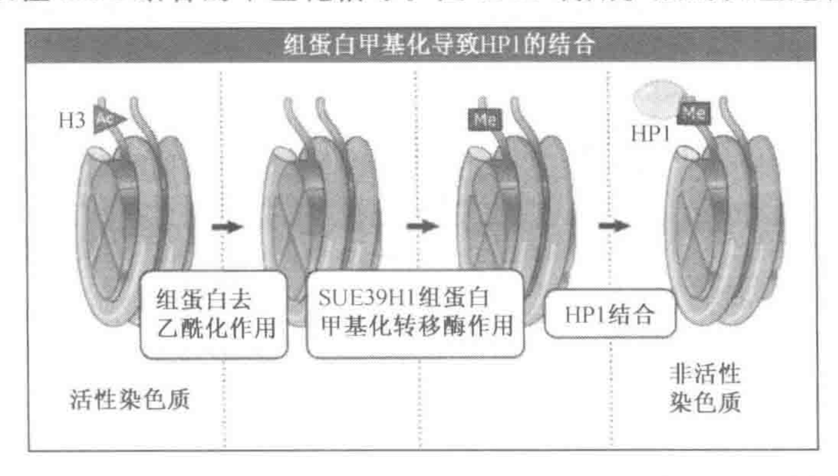


图 6.79 SUE39H1 是一种组蛋白甲基化转移酶，作用于组蛋白 H3 的^{9}Lys。HP1 与甲基化的组蛋白相结合。

染色域与甲基化 Lys 之间的相互作用。这诱发了失活染色质即异染色质的形成。图 6.81 表明,失活的区域可能由于 HP1 分子之间进一步的相互作用而进一步扩展。

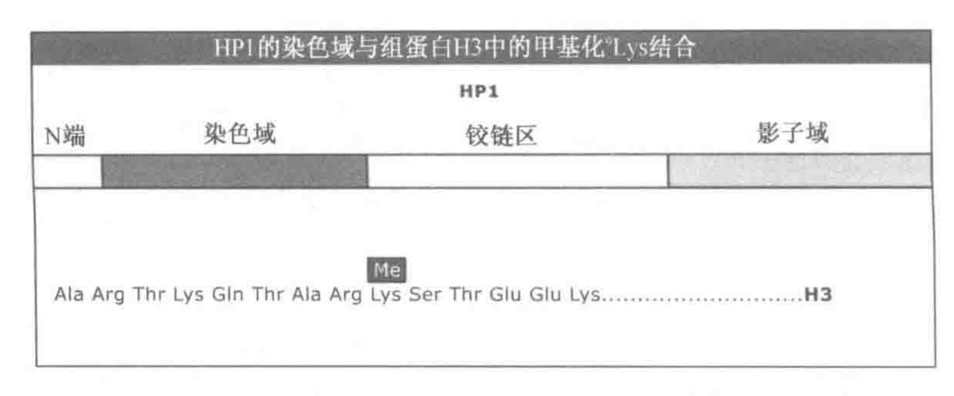


图 6.80 组蛋白 H3 的甲基化产生了 HP1 的结合位点。

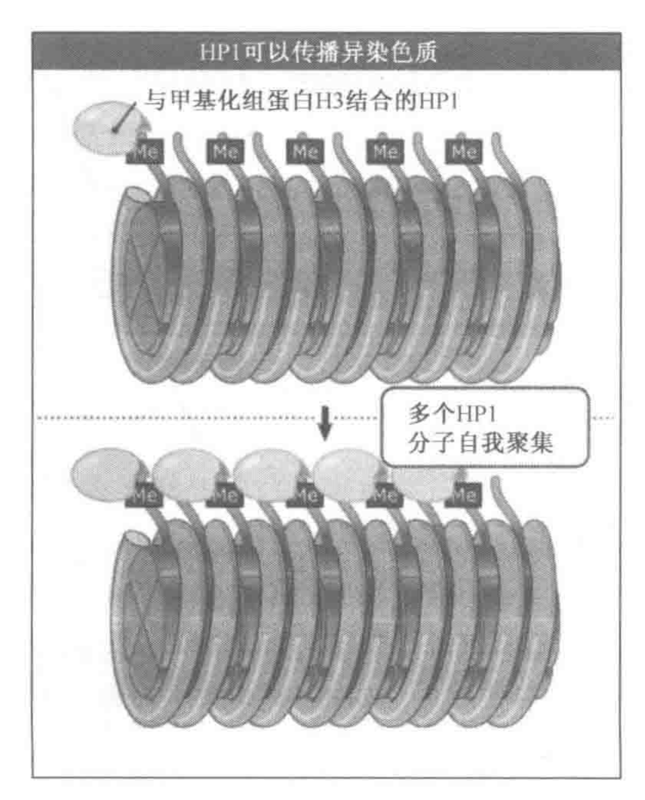


图 6.81 HP1 与甲基化组蛋白 H3 结合形成了沉默的诱因,因为进一步结合 HP1 分子在核小体链上发生了聚集。

有迹象表明,酵母菌中沉默效应的一般性基础的存在依赖于一套共有的遗传座位。一大批基因中任何一个的突变都可以导致两个沉默位点(*HML* 和 *HMR*)的活化,同时释放被整合于端粒异染色质附近的失活基因。因此,这些位点的产物能发挥功能,保持两种类型异染色质的失活状态。

图 6.82 提出了一个这些蛋白质作用的模型:在这些蛋白质中,RAP1 是唯一的序列特异性 DNA 结合蛋白,RAP1 同端粒末端的 $C_{1\text{-}3}A$ 重复序列结合,同时结合于顺式作用的用于抑制 *HML* 和 *HMR* 的沉默子元件上。SIR3 和 SIR4 蛋白(它们可能通过异多聚体的形式起作用)与 RAP1 相互作用,并且它们之间也相互作用。SIR3/SIR4 作用于组蛋白 H3 和 H4 的 N 端尾(事实上,组蛋白参与异染色质形成的最初证据就是,在对解除

HML 和 *HMR* 沉默效应的突变体进行基因做图时发现，突变的基因编码组蛋白 H3 和 H4）。

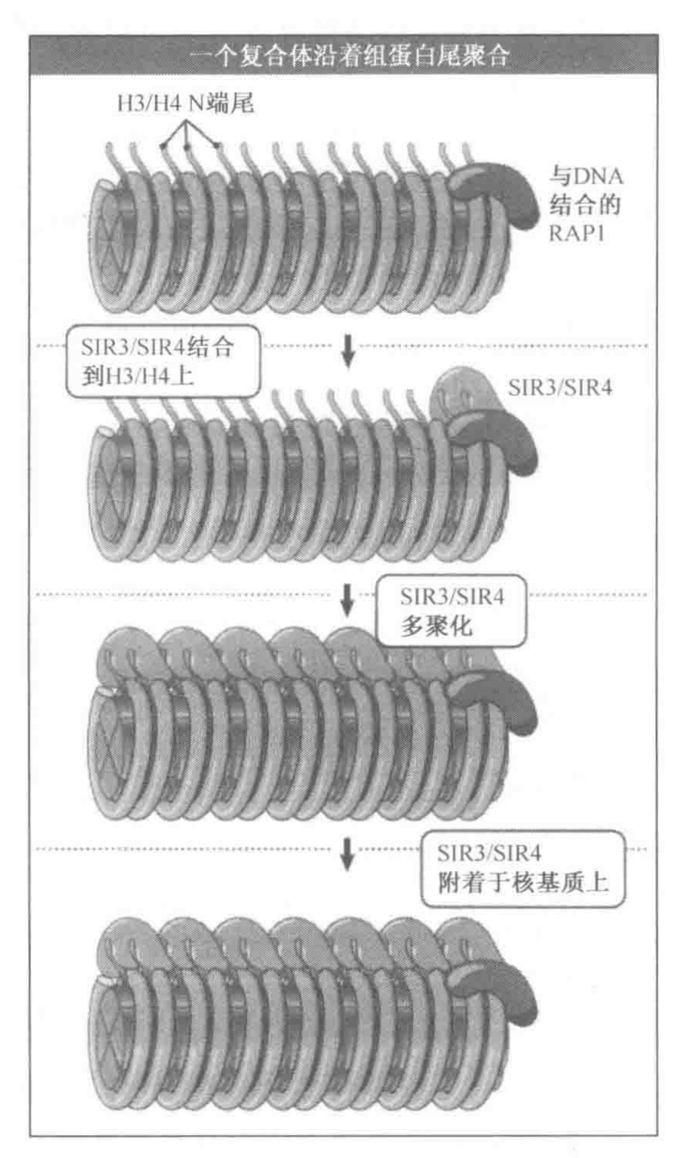


图 6.82　当 RAP1 与 DNA 结合时，异染色质的形成得以启动。SIR3/SIR4 结合到 RAP1 上，也结合到 H3/H4 上。复合体沿着染色质聚合，并可能将端粒连接到核基质上。

在异染色质形成过程中，RAP1 在对 DNA 序列识别过程中起关键作用。RAP1 招募 SIR3/SIR4，它们直接作用于组蛋白 H3 和 H4，形成复合体。一旦 SIR3/SIR4 同组蛋白 H3 和 H4 结合，复合体就进一步多聚化并沿染色质纤维延伸。这可能导致该区域序列的失活，可能的原因为：(1)SIR3/SIR4 复合体本身具有一定的阻遏效应；(2)SIR3/SIR4 结合到组蛋白 H3 和 H4 导致结构发生了进一步的变化。到现在为止，我们还不知道是什么限制了复合体的延伸。SIR 蛋白的 C 端部分同核纤层蛋白(nuclear lamin protein，核基质的组成部分)具有一定的相似性，可能负责将异染色质锚定于核周边。

类似的一系列事件也形成了在 *HMR* 和 *HML* 位点的沉默区域。RAP1、ABF1(转录因子)和 ORC(复制起始复合体)等 3 个序列特异性因子参与了复合体形成的引发过程。在这一情景中，SIR1 同序列特异性因子相结合，募集 SIR2、SIR3 和 SIR4，形成抑制性结构。SIR2 是组蛋白去乙酰酶，去乙酰化对于维持 SIR 复合体和染色质的结合是必需的。

沉默复合体是如何抑制染色质的活性的呢？它可以使染色质固缩，导致调控蛋白不能发现靶序列。可以提出一种最简单的情形——沉默复合体与转录因子和RNA聚合酶是相互之间不能共容存在的。这可能是因为沉默复合体可以抑制染色质重塑，从而间接抑制转录因子的结合，或者直接封堵DNA上转录因子的结合位点。然而，事实可能并不如此简单，因为人们在沉默的染色质区域内的启动子上发现了存在着转录因子和RNA聚合酶，这可能意味着，沉默复合体更倾向于使转录因子不能正常工作，而非抑制转录因子与DNA的结合。事实上，在基因激活因子与染色质的抑制效应间可能存在一种竞争，因此对启动子的激活可以阻止沉默复合体的进一步蔓延。

在着丝粒位置形成的特殊的染色质结构可能也同该区域异染色质的形成有关联（见6.8 着丝粒结合着一个蛋白质复合体）。在人类细胞中，着丝粒特异性蛋白CENP-B对于启动组蛋白H3的修饰（^{9}Lys和^{14}Lys的去乙酰化及随之在^{9}Lys上进行的甲基化）是必需的，对组蛋白的修饰促使其与Swi6蛋白结合起来，从而引起这一区域的异染色质化。

6.32 X染色体经历着全面的改变

关键概念

- 在真哺乳亚纲哺乳动物的胚胎发育过程中，每个细胞中含有的两条X染色体中的一条发生随机失活。
- 在个别的含有多条X染色体的例子中，除一条外，其余所有的X染色体都发生失活。
- *Xic*（X染色体失活中心）是X染色体上的顺式作用区域，对于只有一条X染色体保持活性来说是必需且充分的条件。
- *Xic*包含了*Xist*基因，该基因编码产物为RNA，其表达只存在于失活的X染色体上。
- 阻止*Xist* RNA在活性X染色体上堆积的机制现在还不清楚。

性别的存在呈现了一个有趣的基因调控问题，因为它在X染色体数量上产生了变异。如果在不同性别中，X染色体连锁的基因都进行同等的表达，那么雌性中基因的表达产物量将是雄性的二倍。**剂量补偿效应（dosage compensation）**可以避免产生这种变化，从而使两性中X染色体连锁基因的表达水平一致。现将在不同物种中实现剂量补偿的机制归纳如图6.83。

- 在哺乳动物中，雌性两条X染色体中的一条完全失活，这样，雌性就同雄性一样只有一条具有活性的X染色体。雌性中具有活性的X染色体和雄性仅有的X染色体以同样的水平表达。
- 在果蝇中，雄性中仅有的一条X染色体的表达是雌性中任一X染色体的二倍。
- 在秀丽新小杆线虫（*C. elegans*）中，雌性中每条X染色体的表达只有雄性的唯一一条X染色体表达量的一半。

在所有这些剂量补偿效应机制中有一个共同特点：调控的目标是整个染色体。存在一种数量效应，影响着整个染色体上的所有启动子。现在，我们对哺乳动物雌性X染色体失活了解得最多，其中整条染色体都发生异染色质化。

异染色质的两个主要特性就在于它的固缩形态和相关的基因失活。我们可以把异染色质分为两类：

剂量补偿效应使X-连锁基因的表达发生变化		
哺乳动物	两翼昆虫	蠕虫
失活一条♀X	双倍表达♂X	半量表达♀2X

X
X
X
Y

图 6.83　不同的剂量补偿方式被用于平衡雌雄动物间 X 染色体连锁基因的表达。

• **结构异染色质(constitutive heterochromatin)**含有无编码功能的特异性序列。典型的情况包括卫星 DNA,多存在于着丝粒。由于其固有的性质,这些区域在所有细胞类型中都是永久异染色质形态的。

• **兼性异染色质(facultative heterochromatin)**的情况体现于整条染色体只在一定细胞类型中失活,而在其他的细胞系中则可以表达。最著名的例子便是哺乳动物中的 X 染色体,其中失活的 X 染色体一直保持在异染色质化的状态,而有活性的 X 染色体则属于常染色质。由此可见,同样的 DNA 序列可以存在于两种不同的状态中。一旦失活状态确立,就会在后代细胞中代代相传。这属于表观遗传(epigenetic inheritance)的一个例子,因为它不依赖于 DNA 序列。

我们对哺乳动物雌性 X 染色体这种情况的基本认识来源于 1961 年单 X 假说的提出。含有 X 染色体连锁毛色基因突变的杂合小鼠,具有花斑型的表现型——部分表现为野生型毛色,部分表现为突变型毛色。如图 6.84 所示,这可以解释在一小群发育早期细胞内每个细胞的两条 X 染色体中是否有一条随机失活。带有野生型等位基因的 X 染色体发生失活的细胞,其产生的后代细胞中只表达有活性染色体上的突变型等位基因;那些来源于另一条染色体失活的前体细胞的细胞,则具有一个活性的野生型等位基因。在毛色这个例子中,源于相同祖先细胞的细胞们聚在一起,形成一片相同毛色的区域,于是就产生了不同毛色相杂的斑驳模样。在其他的例子中,群体中的单个细胞只能表达 X 染色体连锁的等位基因之中的一个。如在 X 连锁 *G6PD* 杂合子中,任何一个特定的红细胞只能表达两种等位形式中的一种(在真哺乳动物亚纲,X 染色体失活是随机的;而在有袋目中,选择是定向的——发生失活的总是继承自父本的 X 染色体)。

雌性动物中 X 染色体的失活遵循 N-1 法则,不管含有多少条 X 染色体,除一条外,其余的全部失活。在正常的雌性中,当然只有两条 X 染色体,但是在极个别的情况下,由于染色体不分离可能产生 3X 或更多 X 染色体的表型,只有一条 X 染色体保持活性。这表明存在一种模式,使得某种事件局限在一条染色体中,保护这条染色体躲过所有其他 X 染色体必然要经历的失活命运。

X 染色体上的单个基因座位足以使得失活能够发生。当在 X 染色体和常染色体之间发生易位时,这个基因座位只存在于交互产物中的一条染色体上,并只有这一染色体失活。根据对不同易位的比较,对这个基因座位进行了定位,称为 *Xic*(X 染色体失活中

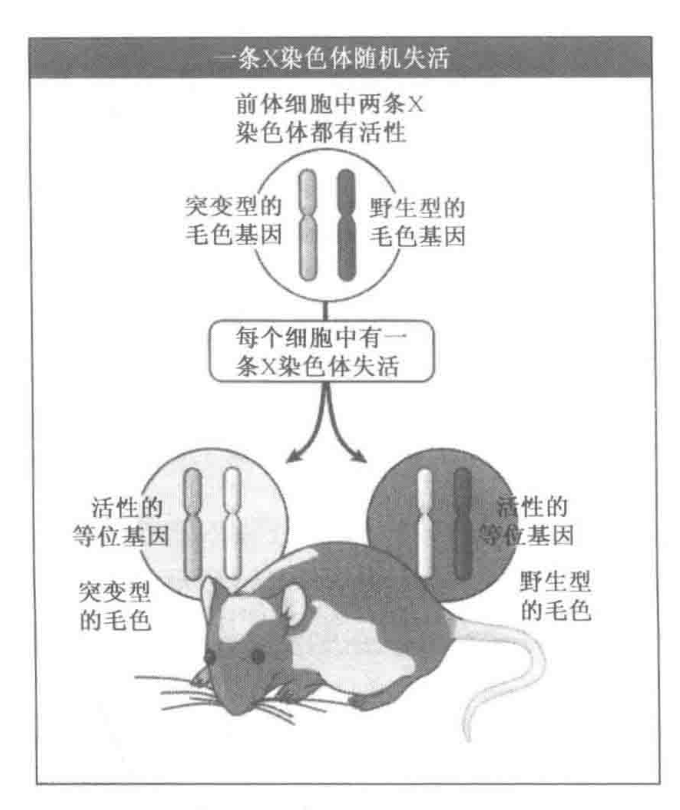


图 6.84 源于每一个前体细胞中一条 X 染色体随机失活的 X 连锁花斑效应。在活性染色体上有+等位基因的细胞具有野生表型，而在活性染色体上有−等位基因的细胞具有突变表型。

心)。一个长为 450kb 的区域包含了 *Xic* 的所有特性。当这一序列作为转基因插入到常染色体中时，该常染色体(在一个细胞培养体系中)也会发生失活。

Xic 是一个顺式作用位点，含有 X 染色体计数和除一条 X 染色体外其他拷贝都失活所需的信息。失活从 *Xic* 基因座开始，并向整条 X 染色体扩展。当 *Xic* 发生 X 染色体-常染色体易位时，失活可以扩展到常染色体区域(虽然其效应并不总是完全的)。

Xic 含有一个基因，称作 *Xist*，只在失活的 X 染色体上表达。这一基因同染色体上的其他被关闭的基因的行为完全相反。删除 *Xist* 可以防止 X 染色体失活，但是这并不影响 X 染色体失活的计数机制(因为其他 X 染色体还是可以失活的)。据此，我们可以辨别出 *Xic* 的两部分特殊成分——一个或几个具有计数功能的未鉴定元件和用于失活的 *Xist* 基因。

图 6.85 说明了 *Xist* RNA 在 X 染色体失活过程中的作用。*Xist* 编码一个没有可读框的 RNA。*Xist* RNA 从它所合成的地方开始"包被"X 染色体，表明它具有结构性的功能。在 X 染色体失活之前，两条染色体都合成此 RNA；随着失活的发生，就只有失活的 X 染色体合成该 RNA 了。

在 X 染色体失活之前，*Xist* RNA 以大约 2h 的半衰期衰减。X 染色体失活是通过将 *Xist* RNA 稳定在失活的 X 染色体上实现的。*Xist* RNA 在 X 染色体上的分布是点状的，表明其可能与蛋白质一起形成颗粒状的结构来使稳定状态得以维持。我们现在还不清楚是否有其他因素参与其中，以及 *Xist* RNA 是如何被限制在染色体上以顺式的方式扩展的。失活染色体的特征——包括缺乏组蛋白 H4 乙酰化以及 CpG 岛甲基化——可能是在比较靠后的时间，作为失活的一部分机制发生的。

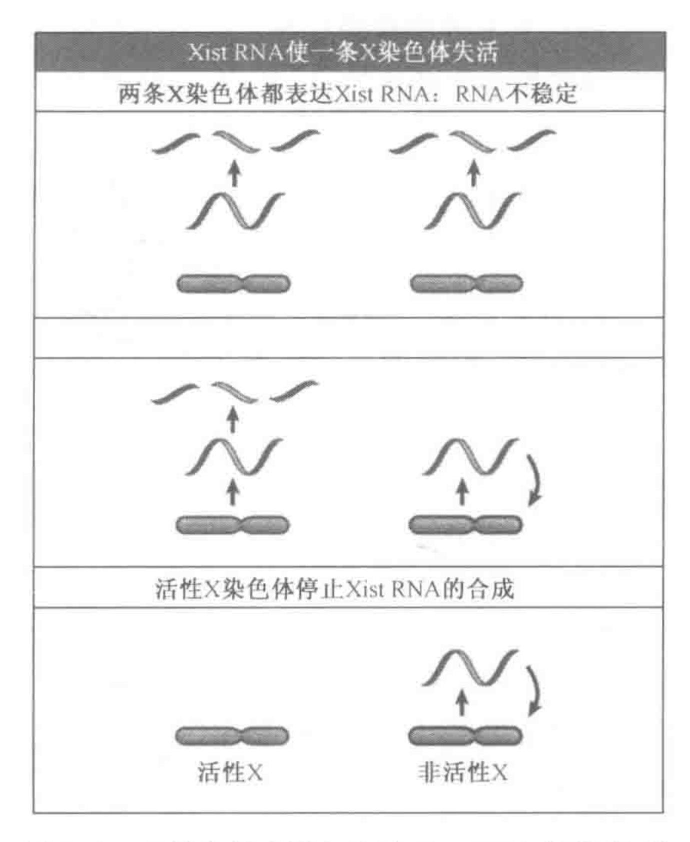


图 6.85　X 染色体失活包含了 *Xist* RNA 的稳定，这些 RNA 包被了失活染色体。

N-1 法则表明 *Xist* RNA 的稳定性是"缺省的"，存在一些阻遏机制来使其中一条 X 染色体（将成为活性染色体）的 *Xist* RNA 稳定性不能保持。这意味着，虽然 *Xic* 对于 X 染色体的失活来说是必需且充分的，但其他基因位点对于活性染色体的建立可能也是必不可少的。

6.33　染色体固缩是由浓缩素（condensin）引起的

关键概念

- SMC 蛋白是含有浓缩素（condensin）和粘连素（cohesin）的 ATP 酶。
- SMC 蛋白异聚体与其他亚单位相结合。
- 固缩通过向 DNA 中引入正超螺旋使染色质进一步紧密地呈螺旋型折叠。
- 浓缩素负责有丝分裂期染色体的固缩。
- 在秀丽新小杆线虫中，染色体特异性的浓缩素负责使失活的 X 染色体固缩。

整个染色体的结构受染色体与 SMC（染色体结构稳定蛋白）蛋白家族相互作用的影响。SMC 是 ATP 酶，可以分为两类：浓缩素（condensin），与染色体整体结构的维持有关，负责有丝分裂期染色质浓缩折叠成紧密压缩的染色体。粘连素（cohesin）被认为可将姐妹染色单体连接在一起，而在有丝分裂时则必须松解开。它们两者都是由 SMC 蛋白形成的二聚体。浓缩素以 SMC2-SMC4 异二聚体为核心，会同其他非 SMC 蛋白形成一个复合体；粘连素具有类似的组成形式，形成一个以 SMC1-SMC3 异二聚体为核心的复合体。

如图 6.86 所示，SMC 蛋白在它的中心部位有一个卷曲螺旋结构，中间有一柔性铰链结构将其分隔开。在氨基端和羧基端都存在 ATP 和 DNA 结合基序。为解释这些蛋白质是依赖分子内二聚化还是分子间二聚化来进行作用，人们提出了不同的模型。

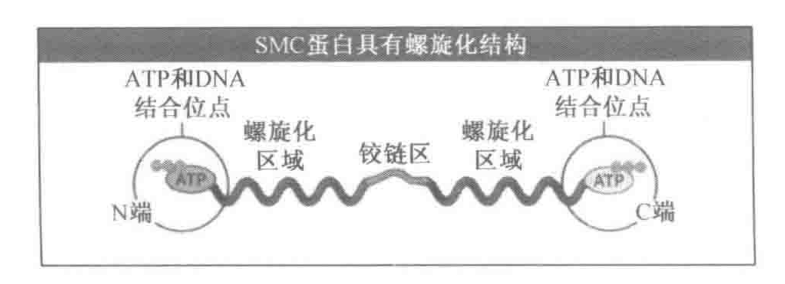


图 6.86 一个 SMC 蛋白具有一个“沃克模块”(Walker module)，两端各有一个 ATP 结合基序和 DNA 结合位点，由中间有铰链区维系的螺旋化区域连接在一起。

针对细菌中 SMC 同源蛋白的实验发现：SMC 蛋白在卷曲螺旋部位以反向平行的形式相互作用形成二聚体，因此，一个亚基的 N 端同另一个的 C 端相互作用。柔性铰链区域的存在使得粘连素和浓缩素可以通过二聚体依赖不同的模式发挥作用。图 6.87 表明，粘连素具有 V 型结构，两臂成 86°角；与之相对的浓缩素则弯曲得更厉害，两臂角度仅有 6°。这使得粘连素可以将两个姐妹染色单体连接在一起，浓缩素则可以使单个染色体固缩。图 6.88 所示为粘连素可以形成一个扩展的二聚体使两条 DNA 分子交联在一起。图 6.89 显示，浓缩素形成 V 型结构的二聚体，在铰链区域有效弯曲，将在同一 DNA 分子上的两个较远的位点拉到一起，使其固缩。

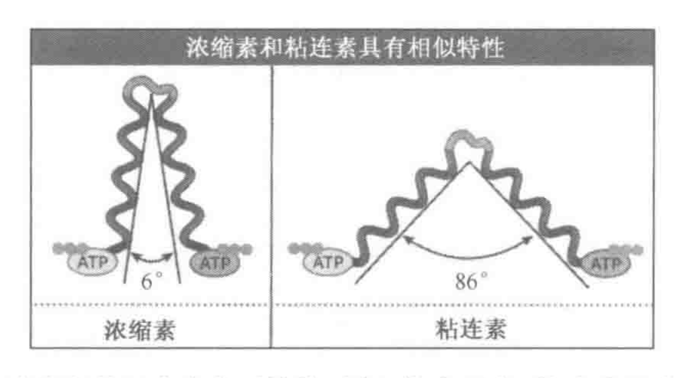


图 6.87 浓缩素的两个半分子结构对折，构成 6°角；粘连素具有较为开阔的构象，两个半分子结构对折成 86°角。

另一个由实验所得的模型则表明，在酵母菌中，SMC 蛋白二聚化时是通过分子内部的相互作用实现的，也就是说，一个同源的二聚体仅由两个完全相同的亚单位组成。不同的蛋白质(如此例中的 SMC1 和 SMC3)则可以通过头部和铰链区域的相互作用，形成如图 6.90 所示的一个环形结构。同直接与 DNA 分子结合不同，这种类型的结构是通过将 DNA 分子环绕起来而将它们绑定在一起。

对有丝分裂染色体的观察发现，浓缩素遍布于整条染色体上，如图 6.91(见图版)所示(与之相对的，粘连素则是不连续分布的)。

浓缩素复合体由于其能在体外使染色质固缩的能力而得名。在水解 ATP 和拓扑异构酶Ⅰ存在的条件下，它可以向 DNA 中引入正超螺旋。这一能力受有丝分裂时期非

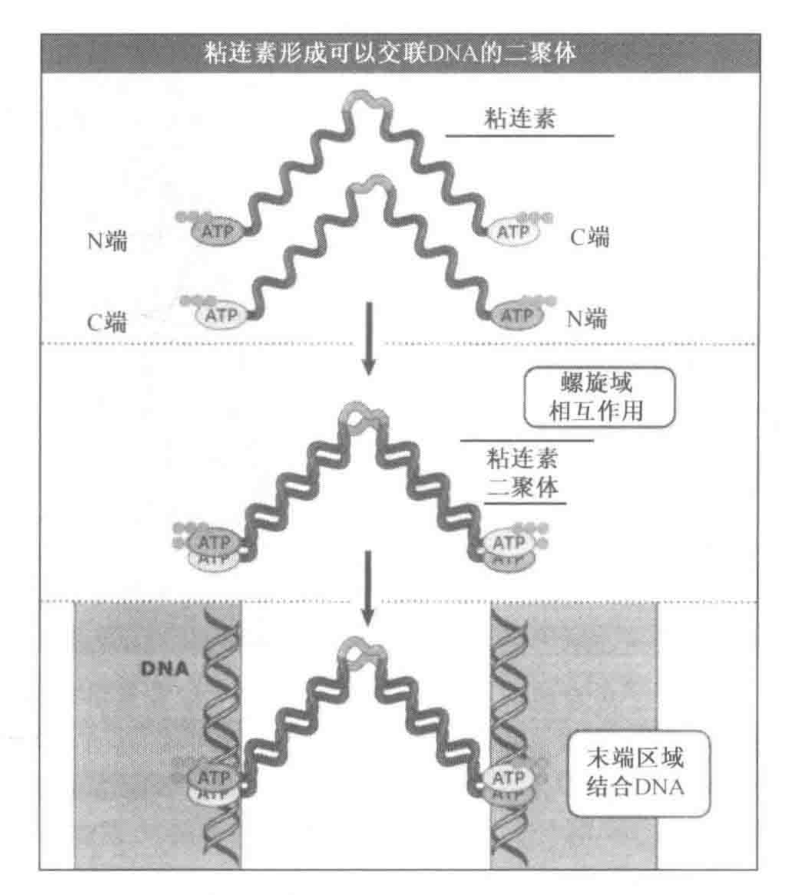


图 6.88　SMC 蛋白通过中央螺旋化结构的反相平行形成二聚体，每个亚基的两个末端区域都具有 ATP 和 DNA 结合基序；粘连素可以形成扩展的结构，使得两个不同的 DNA 分子连接起来。



图 6.89　浓缩素可以通过铰链弯曲形成一个压缩的结构，导致 DNA 的压缩。

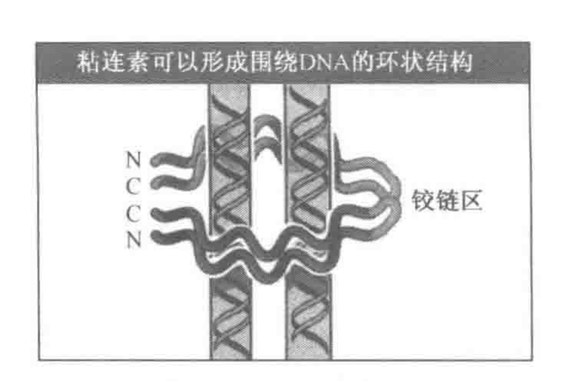


图 6.90 粘连素可以通过分子内连接形成二聚体，然后再在头部和铰链区连接，形成多聚体。这样的一个结构可以通过将两个 DNA 分子包围起来而将它们容纳在一起。



图 6.91 浓缩素沿着整条有丝分裂的长度定位。图中红色的是 DNA，黄色的是浓缩素。照片由冷泉港实验室的 Ana Losada 和 Tatsuya Hirano 惠赠。

SMC 亚单位的磷酸化控制。我们还不清楚这同染色质其他修饰（如组蛋白磷酸化）之间的联系。在有丝分裂时期浓缩素复合体的特异活化让我们不禁想问，它是否也参与间期异染色质的形成？

在其他类型的剂量补偿效应中也有普遍的变化。在果蝇中，在雄性中发现一种蛋白复合体，定位于 X 染色体上。在秀丽新小杆线虫中，在 XX 胚胎中，有一种蛋白复合体与两条 X 染色体都相联系。但是，在 XO 胚胎的核中，这一蛋白组分保持弥散的分布状态。这一蛋白复合体含有 SMC 核心，并同其他物种中与有丝分裂相关的浓缩素复合体相类似。这表明其在使染色体表现为更高压缩比的失活形态中具有结构性的作用。X 染色体上的很多位点对于复合体在染色体上完全地分布是必需的。复合体先同这些位点相结合，然后在染色体上扩展，使蛋白复合体更彻底地覆盖染色体。

在染色质活性与组蛋白乙酰化之间存在一个普遍的联系，特别是在组蛋白 H3 和 H4 中发生在 N 端尾的乙酰化。转录激活同启动子附近区域的乙酰化有关，而转录抑制则与去乙酰化相关（见 MOIB：6-0007）。最大的戏剧性关联则是哺乳动物雌性细胞的失活 X 染色体上组蛋白 H4 的低乙酰化。

6.34 展望

自从核小体的发现对染色质的研究产生了革命性的影响，相关研究就形成了两条并行的线索：

- 结构分析：包括核小体自身的描述和核小体是如何向更高级结构进一步组装的描述。
- 核小体相关的功能分析：将转录激活与转录过程中发生的事件与染色质的结构相

联系，进行机理探讨。

沿着这些研究线索，当前最当务之急的问题就是，从核小体和其他组成型蛋白的角度确定 30 nm 染色质纤维的结构，以便研究转录激活和转录失活装置是如何借助修饰核小体以实现各自的功能的。

在 20 世纪 70 年代，组蛋白被认为是转录的一般性阻遏因子，基因要转录就必须中和组蛋白的影响。然而却很少有人研究这一效应是怎么实现的，至多相信组蛋白以某种方式移除可能是为了让转录激活因子更好地接近 DNA。考虑到我们现在所知道的程度，我们可以看出：我们即将可以从结构的角度实现对染色质功能的确定。对于乙酰化、去乙酰化及其他对组蛋白进行修饰的酶的地位的确定，现在已经有了巨大的进步。我们开始寻找这些修饰如何使染色质结构发生改变从而激活启动子的机理；我们已经接近于可以从这些结构相互作用的角度来解释启动子是如何激活的。将组蛋白看作是抑制子，我们现在已经开始了解它们是如何同其他蛋白质相互作用从而产生可以进行表观遗传方式传播的异染色质结构的，从而将局部或染色质的很大区域失活掉。随着对单个组分结构的越来越高分辨率的分析，也就是在对单个组蛋白分子和其他染色质蛋白变化的分析基础上，我们有希望对这里描述过的事件有一个全面的理解。

对于染色质高级结构的组织形式（也就是染色体自身）的理解目前仍然比较困难。虽然基因组分析已经取得巨大的进展，我们仍然对于“带”和“间带”、CpG 岛的丰度等结构特征的重要性所知不多，我们甚至还不能将这些特征同 DNA 与蛋白质的相互作用联系起来。虽然现在已经了解了 30 nm 纤维的结构，但是我们仍然需要对更高级结构的组织进行了解。虽然我们现在已经了解高级真核生物着丝粒 DNA 序列的作用，其他的重要特征典型的结构（如染色体上的着丝粒和端粒）仍然还需要进一步从分子上去研究。

就像在生物学的其他领域一样，将越来越精细的结构剖析和功能改变联系起来的能力，为在更深入水平上的理解、学习提供了有力的保障。

6.35 总结

所有有机体和病毒的遗传物质都以紧密包装的核蛋白形式存在。在真核生物中，转录激活序列位于常染色质上，常染色质占间期染色质的大部分；异染色质区域的压缩比是常染色质的 5～10 倍，且不能转录。在细胞分裂过程中，所有染色质都进行压缩包装，单个染色体可以分辨。在用 Giemsa 染色时，G 带的出现表明，在染色体上存在可再现的超显微结构。G 带的区域非常大，约为 10^7 bp，可以用来对染色体易位或其他大的结构变化进行做图。

在真核生物中，间期染色质和中间染色体都被组织形成大的突环。每个突环是一个独立的超螺旋域。这些突环相互联系成中期支架；突环的碱基通过特定的 DNA 位点与核基质或者中期核骨架连在一起。

着丝粒区域含有动粒，动粒负责将染色体绑定到有丝分裂的纺缍丝上，着丝粒通常被异染色质环绕。现在只有酵母菌 *S. cerevisiae* 的着丝粒序列被测定，包括短保守片段——CDE-Ⅰ和 CDE-Ⅲ（分别与 CBF1 和 CBF3 复合体结合），以及一个长的 A-T 富集区域，称为 CDE-Ⅱ（与 Cse4p 在染色质中形成一个特殊结构）。另外一组结合的蛋白质将染色质与微管结合。

端粒使染色体的末端保持稳定。差不多所有已知的端粒都含有多重复片段，其中一条链上的序列为$C_n(A/T)_m$，这里$n>1$，$m=1\sim4$；另一条链的序列为$G_n(T/A)_m$，有一个突出的末端，可作为模板在另一条链上有序添加碱基。端粒酶是一个核糖核蛋白，其中的RNA组分作为合成富含G链的模板。这就克服了复制时一个末端突出无法复制的问题。端粒可以稳定染色体末端，突出的单链$G_n(T/A)_m$取代它端粒上较早的同源重复片段形成一个突环，因此没有自由末端。

两栖类的灯刷染色体和昆虫的多线染色体通常都有突出的压缩比小于100的延伸结构。果蝇的多线染色体根据大小可分成约5000条带，平均大小约25kb。即使在折叠情况下也可以看到转录激活的区域(泡状结构)，其中染色质物质从染色体轴上凸出来。当常染质中的序列被转录时，类似的变化也可能小规模地发生。

所有真核生物的染色质都是由核小体组成的。核小体含有一定长度的DNA，一般约200bp，围绕在由H2A、H2B、H3和H4各两个所形成的八聚体上，每个核小体由一个H1组蛋白联系着。实际上，差不多所有的基因组DNA都组织形成核小体。用微球菌核酸酶处理被组装成核小体的DNA，一般可被分成两部分，接头区被核酸酶迅速降解，146bp的核心区域则对降解有抗性。组蛋白H3和H4是高度保守的，$H3_2 \cdot H4_2$四聚体组成颗粒的直径大小，组蛋白H2A和H2B形成两个H2A・H2B二聚体。八聚体是由两个H2A・H2B二聚体添加到$H3_2 \cdot H4_2$核心上形成的。

核小体组装成直径30nm的纤丝(核丝)，核丝的每圈含有6个核小体，压缩比为40。移除H1蛋白可以使核丝伸展成10nm纤维——由核小体线性排列形成的串。直径30nm的核丝可能是由10nm的纤维形成的螺线管。直径30nm的核丝是常染色质和异染色质的基本组成部分，非组蛋白负责将核丝进一步组装成染色质或染色体等超显微结构。

核小体组装有两种途径。在复制伴随途径中，复制体的PCNA持续合成亚单位招募CAF-1——一个核小体装配因子。CAF-1将复制过程中的$H3_2 \cdot H4_2$四聚体降解为姐妹二聚体。四聚体是由复制过程中复制叉对已有核小体的扰乱作用或者新合成的核小体装配产生的。相似来源的H2A・H2B二聚体同$H3_2 \cdot H4_2$四聚体装配形成核小体。由于$H3_2 \cdot H4_2$和H2A・H2B是随机装配的，因此新的核小体中可能既有先前存在的又有新合成的组蛋白。

在转录过程中，RNA聚合酶取代组蛋白八聚体的位置。RNA转录酶转录过后核小体将很快重建，除非转录非常活跃，组蛋白完全被取代。复制伴随的核小体组装方式负责将转录时被取代的组蛋白重新组装形成八聚体。这里用组蛋白变体H3.3代替组蛋白H3起作用。在另一种类似的装配方式中，采用H3的另一种变体，用于着丝粒DNA序列复制后的核小体组装。

两种对核酸酶敏感性的变化同基因的活性有关。可以进行转录的染色质对DNaseⅠ特别敏感，反映出富含基因激活或者潜在激活位点的结构域存在结构上的差异。在DNA上存在一些分散的超敏感位点，对DNaseⅠ具有高度的敏感性。一个超敏感位点包含200bp的DNA序列，在这段的序列上因其他蛋白质的存在排除了核小体。一个超敏感位点形成一个界限，可能使得相邻的核小体被限制在其位点上。在对调节蛋白接近DNA的控制中，核小体的定位可能很重要。

如果调控区被组装在核小体之中，基因通常就不会表达。如果没有特异性的调节蛋白，启动子和其他调节区与组蛋白八聚体一起进行包装，就成为不能被活化的状态。这也就解释了核小体为什么在启动子附近必须精确定位，以使一些对调控重要的位点适当地暴露表达出来。一些转录因子具有能够识别核小体表面 DNA 序列的能力。DNA 序列的特异定位对于转录起始来说可能是必需的。

活性染色质和非活性染色质并不平衡，在两者相互转化过程中会发生一些突然的急剧变化事件。染色质重塑复合体可以利用 ATP 水解所得的能量来替代组蛋白八聚体。重塑复合体都比较大，根据所携 ATPase 亚基的不同类型常可以对它进行分类，两种普通的类型是 SWI/SNF 和 ISW。染色质重塑复合体的一种典型形式是用于从特异 DNA 序列中替换一个或者多个组蛋白八聚体，结果形成一个界限，使相邻的核小体可以进行精确或者有偏好的定位。染色质重塑可能需要核小体位置的改变，有时候也需要组蛋白八聚体沿着 DNA 链滑行。

组蛋白的乙酰化既发生在复制也发生在转录过程中，并且对于形成一种压缩程度较低的染色质结构可能是必要的。将转录因子连接到基本装置上的某些辅助激活因子(co-activator)都具有组蛋白乙酰化活性。一些与转录因子相关的协同激活子都具有组蛋白乙酰化酶活性；与之相对，抑制子也可能都与去乙酰化酶活性相关。这些修饰性酶通常特异地作用于特定组蛋白的特定氨基酸序列。修饰最常发生的位点位于组蛋白 H3 和 H4 的 N 端尾，这些部位从核小体上 DNA 序列之间的转折处伸展出来。活化（或抑制）复合体通常都比较大，且含有多种活性来对染色质进行不同的修饰。

异染色质的形成通过与组蛋白相互作用的、与特定的染色体区域（如端粒）结合的蛋白质来实现。一个非活性结构的形成可能从其起始中心开始沿着染色质线性结构传播。相似的事件也发生在非活性的酵母交配型的沉默过程中。

异染色质的形成可能起始于特定位点，然后传播一段距离（目前还未精确确定）。当异染色质状态建立以后，就会随着细胞分裂代代相传，这就产生了表观遗传效应，完全相同的 DNA 序列因为与不同的蛋白质结构结合，从而导致不同的表达活性。这也就解释了果蝇中位置效应的多样性。

对组蛋白尾进行修饰是进行染色质重新组装的扳机。乙酰化通常与基因的活化有关。在活化复合体中发现了组蛋白乙酰化酶活性，而在抑制复合体中则发现了组蛋白去乙酰化活性。组蛋白的甲基化多与基因失活有关，一些组蛋白修饰可能是独自作用的或者与其他修饰进行协同作用的。

酵母菌端粒失活染色质同沉默的交配型基因座看来具有共同的机理，涉及普通蛋白质与组蛋白 H3 和 H4 的 N 端尾进行的相互作用。蛋白质同特异 DNA 序列的结合启动失活复合体的装配，然后其他组分通过协同方式沿染色体进行多聚化。

在真哺乳动物中，雌性动物的一条 X 染色体失活是以随机的方式发生的。*Xic* 基因座对于 X 染色体的失活与 X 染色体计数来说是充分且必要的。N-1 法则保证除一条外其他所有的 X 染色体全部失活。*Xic* 基因座包含基因 *Xist*，其编码的 RNA 仅在失活的 X 染色体上进行表达。*Xist* RNA 的稳定是一种机制，根据这一机制可以辨别失活 X 染色体。

参考文献

6.3 染色体具有显带特性

研究

International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* v. 409 p. 860–921.

Saccone, S., De Sario, A., Wiegant, J., Raap, A. K., Della Valle, G., and Bernardi, G., 1993. Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 90 p. 11929–11933.

Venter, J. C., et al., 2001. The sequence of the human genome. *Science* v. 291 p. 1304–1350.

6.4 真核生物DNA含有结合到染色体支架上的袢环和结构域

研究

Postow, L., Hardy, C. D., Arsuaga, J., and Cozzarelli, N. R., 2004. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* v. 18 p. 1766–1779.

6.6 着丝粒对于染色体分离是必需的

综述

Hyman, A. A. and Sorger, P. K., 1995. Structure and function of kinetochores in budding yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 471–495.

6.7 芽殖酵母(*S. cerevisiae*)的着丝粒具有短DNA序列

综述

Blackburn, E. H. and Szostak, J. W., 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* v. 53 p. 163–194.

Clarke, L., and Carbon, J., 1985. The structure and function of yeast centromeres. *Annu. Rev. Genet.* v. 19 p. 29–56.

研究

Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L., and Carbon, J., 1982. Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* v. 29 p. 235–244.

6.8 着丝粒结合着一个蛋白质复合体

综述

Kitagawa, K., and Hieter, P., 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 678–687.

研究

Lechner, J., and Carbon, J., 1991. A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* v. 64 p. 717–725.

Meluh, P. B., and Koshland, D., 1997. Budding yeast centromere composition and assembly as revealed by *in vitro* cross-linking. *Genes Dev.* v. 11 p. 3401–3412.

Meluh, P. B., et al., 1998. Cse4p is a component of the core centromere of *S. cerevisiae*. *Cell* v. 94 p. 607–613.

Ortiz, J., Stemmann, O., Rank, S., and Lechner, J., 1999. A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes Dev.* v. 13 p. 1140–1155.

6.9 着丝粒可能含有重复的DNA序列

综述

Wiens, G. R., and Sorger, P. K., 1998. Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* v. 93 p. 313–316.

研究

Copenhaver, G. P., et al., 1999. Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres. *Science* v. 286 p. 2468–2474.

Haaf, T., Warburton, P. E., and Willard, H. F., 1992. Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: Centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell* v. 70 p. 681–696.

Sun, X., Wahlstrom, J., and Karpen, G., 1997. Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* v. 91 p. 1007–1019.

6.10 端粒以一种特殊的机制进行复制

综述

Blackburn, E. H., and Szostak, J. W., 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* v. 53 p. 163–194.

Zakian, V. A., 1989. Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* v. 23 p. 579–604.

研究

Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R., 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* v. 277 p. 955–959.

Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P., and Zakian, V. A., 1996. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* v. 85 p. 423–433.

6.11 端粒封闭了染色体末端

研究

Griffith, J. D., et al., 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* v. 97

p. 503–514.
Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T., 1999. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* v. 283 p. 1321–1325.
van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T., 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* v. 92 p. 401–413.

6.15 核小体是所有染色体的亚单位

综述

Kornberg, R. D., 1977. Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* v. 46 p. 931–954.
McGhee, J. D., and Felsenfeld, G., 1980. Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* v. 49 p. 1115–1156.

研究

Kornberg, R. D., 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* v. 184 p. 868–871.
Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A., 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* v. 311 p. 532–537.

6.16 DNA盘绕在核小体阵列上

研究

Finch, J. T. et al., 1977. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* v. 269 p. 29–36.

6.17 核小体拥有一个共同的结构基础

研究

Shen, X., et al., 1995. Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vitro*. *Cell* v. 82 p. 47–56.

6.18 在核小体表面DNA的结构变化多端

综述

Travers, A. A., and Klug, A., 1987. The bending of DNA in nucleosomes and its wider implications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 317 p. 537–561.
Wang, J., 1982. The path of DNA in the nucleosome. *Cell* v. 29 p. 724–726.

研究

Richmond, T. J., and Davey, C. A., 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* v. 423 p. 145–150.

6.19 组蛋白八聚体的组装

研究

Angelov, D., Vitolo, J. M., Mutskov, V., Dimitrov, S., and Hayes, J. J., 2001. Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 6599–6604.
Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N., 1991. The nucleosomal core histone octamer at 31 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 88 p. 10148–10152.
Luger, K., et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 28 Å resolution. *Nature* v. 389 p. 251–260.

6.20 在染色质纤丝上核小体的分布路径

综述

Felsenfeld, G. and McGhee, J. D., 1986. Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* v. 44 p. 375–377.

研究

Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., and Richmond, T. J., 2004. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* v. 306 p. 1571–1573.

6.21 染色质的再生需要核小体的组装

综述

Osley, M. A., 1991. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* v. 60 p. 827–861.
Verreault, A., 2000. De novo nucleosome assembly: New pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* v. 14 p. 1430–1438.

研究

Ahmad, K., and Henikoff, S., 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* v. 9 p. 1191–1200.
Ahmad, K., and Henikoff, S., 2001. Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J. Cell Biol.* v. 153 p. 101–110.
Gruss, C., Wu, J., Koller, T., and Sogo, J. M., 1993. Disruption of the nucleosomes at the replication fork. *EMBO J.* v. 12 p. 4533–4545.
Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Scamps, C., Martini, E. M., Lipinski, M., and Almouzni, G., 2002. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell* v. 9 p. 1091–1100.
Shibahara, K., and Stillman, B., 1999. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* v. 96 p. 575–585.
Smith, S., and Stillman, B., 1989. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*. *Cell* v. 58 p. 15–25.
Smith, S., and Stillman, B., 1991. Stepwise assembly of chromatin during DNA replication *in vitro*. *EMBO J.* v. 10 p. 971–980.
Yu, L., and Gorovsky, M. A., 1997. Constitutive

expression, not a particular primary sequence, is the important feature of the H3 replacement variant hv2 in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* v. 17 p. 6303–6310.

6.23 结构域的含义是包含转录活性基因的区域

研究

Stalder, J. et al., 1980. Tissue-specific DNA cleavage in the globin chromatin domain introduced by DNAase I. *Cell* v. 20 p. 451–460.

6.24 转录的基因是否被组装在核小体之中？

综述

Kornberg, R. D., and Lorch, Y., 1992. Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 8 p. 563–587.

6.25 转录中组蛋白八聚体被替换

研究

Cavalli, G., and Thoma, F., 1993. Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *EMBO J.* v. 12 p. 4603–4613.

Studitsky, V. M., Clark, D. J., and Felsenfeld, G., 1994. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template *Cell.* v. 76 p. 371–382.

6.26 核小体替换和重新组装需要特殊因子

研究

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M., and Reinberg, D., 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* v. 301 p. 1090–1093.

Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., and Lis, J. T., 2003. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science* v. 301 p. 1094–1096.

6.27 DNA酶高度敏感位点改变染色质的结构

综述

Gross, D. S., and Garrard, W. T., 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* v. 57 p. 159–197.

研究

Moyne, G., Harper, F., Saragosti, S., and Yaniv, M., 1982. Absence of nucleosomes in a histone-containing nucleoprotein complex obtained by dissociation of purified SV40 virions. *Cell* v. 30 p. 123–130.

Scott, W. A., and Wigmore, D. J., 1978. Sites in SV40 chromatin which are preferentially cleaved by endonucleases. *Cell* v. 15 p. 1511–1518.

Varshavsky, A. J., Sundin, O., and Bohn, M. J., 1978. SV40 viral minichromosome: Preferential exposure of the origin of replication as probed by restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* v. 5 p. 3469–3479.

6.28 染色质重塑是一个活跃过程

综述

Becker, P. B., and Horz, W., 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* v. 71 p. 247–273.

Felsenfeld, G., 1992. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* v. 355 p. 219–224.

Grunstein, M., 1990. Histone function in transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 6 p. 643–678.

Jenuwein, T., and Allis, C. D., 2001. Translating the histone code. *Science* v. 293 p. 1074–1080.

Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E., 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* v. 108 p. 475–487.

Peterson, C. L., and Côté, J., 2004. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* v. 18 p. 602–616.

Tsukiyama, T., 2002. The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 422–429.

Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L., 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell Biol.* v. 20 p. 1899–1910.

研究

Cairns, B. R., Kim, Y.- J., Sayre, M. H., Laurent, B. C., and Kornberg, R., 1994. A multisubunit complex containing the SWI/ADR6, SWI2/1, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 91 p. 1950–622.

Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., and Peterson, C. L., 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* v. 265 p. 53–60.

Gavin, I., Horn, P. J., and Peterson, C. L., 2001. SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology. *Mol. Cell* v. 7 p. 97–104.

Hamiche, A., Kang, J. G., Dennis, C., Xiao, H., and Wu, C., 2001. Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 14316–14321.

Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A., and Emerson, B. M., 2000. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* v. 14 p. 2441–2451.

Kingston, R. E., and Narlikar, G. J., 1999. ATP-de-

pendent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* v. 13 p. 2339–2352.

Kwon, H., Imbaizano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E., and Green, M. R., 1994. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding of human SWI/SNF complex. *Nature* v. 370 p. 477–481.

Logie, C. and Peterson, C. L., 1997. Catalytic activity of the yeast SWI/SNF complex on reconstituted nucleosome arrays. *EMBO J.* v. 16 p. 6772–6782.

Lorch, Y., Cairns, B. R., Zhang, M., and Kornberg, R. D., 1998. Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell* v. 94 p. 29–34.

Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R. D., 1999. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* v. 96 p. 389–392.

Peterson, C. L., and Herskowitz, I., 1992. Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* v. 68 p. 573–583.

Robert, F., Young, R. A., and Struhl, K., 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome remodeling complex. *Genes Dev.* v. 16 p. 806–819.

Schnitzler, G., Sif, S., and Kingston, R. E., 1998. Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* v. 94 p. 17–27.

Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C., and Kennison, J. A., 1992. Brahma: A regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* v. 68 p. 561–572.

Tsukiyama, T., Daniel, C., Tamkun, J., and Wu, C., 1995. ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell* v. 83 p. 1021–1026.

Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C. C., Shiloach, J., and Wu, C., 1999. Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* v. 13 p. 686–697.

Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B. R., White, M. F., Workman, J. L., and Owen-Hughes, T., 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* v. 400 p. 784–787.

Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., and Peterson, C. L., 1999. Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* v. 13 p. 2369–2374.

6.29 组蛋白乙酰化与遗传活性相关

综述

Hirose, Y., and Manley, J. L., 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* v. 14 p. 1415–1429.

Orphanides, G., and Reinberg, D., 2000. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* v. 407 p. 471–475.

Richards, E. J., Elgin, S. C., and Richards, S. C., 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell* v. 108 p. 489–500.

Verreault, A., 2000. De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* v. 14 p. 1430–1438.

研究

Akhtar, A., and Becker, P. B., 2000. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol. Cell* v. 5 p. 367–375.

Bortvin, A., and Winston, F., 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* v. 272 p. 1473–1476.

Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K., 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* v. 97 p. 299–311.

Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L., 2001. Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* v. 104 p. 817–827.

Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N., and Chalkley, R., 1976. Modifications to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* v. 104 p. 471–483.

Ling, X., Harkness, T. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M., 1996. Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly *in vivo* and *in vitro*: Redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev.* v. 10 p. 686–699.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D., 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* v. 92 p. 105–116.

Shibahara, K., Verreault, A., and Stillman, B., 2000. The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1-mediated nucleosome assembly onto replicated DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 7766–7771.

Turner, B. M., Birley, A. J., and Lavender, J., 1992. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* v. 69 p. 375–384.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratowski, S.,

and Handa, H., 1998. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.* v. 12 p. 343–356.

6.30 异染色质由一个成核事件产生

研究

Ahmad, K., and Henikoff, S., 2001. Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell* v. 104 p. 839–847.

6.31 异染色质的性质依赖于与组蛋白的相互作用

综述

Loo, S., and Rine, J., 1995. Silencing and heritable domains of gene expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 519–548.

Moazed, D., 2001. Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol. Cell* v. 8 p. 489–498.

Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L., and Rine, J., 2003. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 481–516.

Thompson, J. S., Hecht, A., and Grunstein, M., 1993. Histones and the regulation of heterochromatin in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v. 58 p. 247–256.

Zhang, Y. and Reinberg, D., 2001. Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* v. 15 p. 2343–2360.

研究

Ahmad, K., and Henikoff, S., 2001. Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell* v. 104 p. 839–847.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* v. 410 p. 120–124.

Cheutin, T., McNairn, A. J., Jenuwein, T., Gilbert, D. M., Singh, P. B., and Misteli, T., 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* v. 299 p. 721–725.

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M., 1995. Histone H3 and H4 N-termini interact with the silent information regulators SIR3 and SIR4: A molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* v. 80 p. 583–592.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L., 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* v. 403 p. 795–800.

James, T. C., and Elgin, S. C., 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *D. melanogaster* and its gene. *Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 3862–3872.

Kayne, P. S., Kim, U. J., Han. M., Mullen, R. J., Yoshizaki, F., and Grunstein, M., 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* v. 55 p. 27–39.

Koonin, E. V., Zhou, S., and Lucchesi, J. C., 1995. The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res.* v. 23 p. 4229–4233.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T., 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* v. 410 p. 116–120.

Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R., 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 5807–5811.

Manis, J. P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K., and Alt, F. W., 1998. Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J. Exp. Med.* v. 187 p. 2081–2089.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D., 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* v. 8 p. 2257–2269.

Nakagawa, H., Lee, J. K., Hurwitz, J., Allshire, R. C., Nakayama, J., Grewal, S. I., Tanaka, K., and Murakami, Y., 2002. Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev.* v. 16 p. 1766–1778.

Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., and Grewal, S. I., 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* v. 292 p. 110–113.

Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, L., and Gasser, S. M., 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* v. 75 p. 543–555.

Platero, J. S., Hartnett, T., and Eissenberg, J. C., 1995. Functional analysis of the chromo do-

main of HP1. *EMBO J.* v. 14 p. 3977–3986.
Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., and Reuter, G., 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* v. 21 p. 1121–1131.
Sekinger, E. A., and Gross, D. S., 2001. Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell* v. 105 p. 403–414.
Shore, D., and Nasmyth, K., 1987. Purification and cloning of a DNA-binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* v. 51 p. 721–732.
Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C., and Boeke, J. D., 2000. A phylogenetically conserved NAD^+-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 6658–6663.

6.32 X染色体经历着全面的改变

综述

Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D. A., and Panning, B., 2002. Xist RNA and the mechanism of x chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* v. 36 p. 233–278.

研究

Jeppesen, P., and Turner, B. M., 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* v. 74 p. 281–289.
Lee, J. T. et al., 1996. A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell* v. 86 p. 83–94.
Lyon, M. F., 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature* v. 190 p. 372–373.
Panning, B., Dausman, J., and Jaenisch, R., 1997. X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* v. 90 p. 907–916.
Penny, G. D., et al., 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* v. 379 p. 131–137.

6.33 染色体固缩是由浓缩素(condensin)引起的

综述

Hirano, T., 2000. Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu. Rev. Biochem.* v. 69 p. 115–144.
Hirano, T., 1999. SMC-mediated chromosome mechanics: A conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev.* v. 13 p. 11–19.
Hirano, T., 2002. The ABCs of SMC proteins: Two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* v. 16 p. 399–414.
Jessberger, R., 2002. The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 767–778.
Nasmyth, K., 2002. Segregating sister genomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science* v. 297 p. 559–565.

研究

Csankovszki, G., McDonel, P., and Meyer, B. J., 2004. Recruitment and spreading of the *C. elegans* dosage compensation complex along X chromosomes. *Science* v. 303 p. 1182–1185.
Haering, C. H., Lowe, J., Hochwage, A., and Nasmyth, K., 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* v. 9 p. 773–788.
Kimura, K., Rybenkov, V. V., Crisona, N. J., Hirano, T., and Cozzarelli, N. R., 1999. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: Implications for chromosome condensation. *Cell* v. 98 p. 239–248.

梁前进 译

第4篇　细 胞 骨 架

第7章　微管

第8章　肌动蛋白

第9章　中间纤维



第7章 微　　管

Lynne Cassimeris
Department of Biological Sciences, Lehigh University, Bethlehem, PA

本章概要

7.1　导言

关键概念

- 细胞骨架由蛋白多聚体组成。每个多聚体由数千个聚集在一起构成丝状结构的相同的亚单位构成。
- 细胞骨架产生了细胞运动并给细胞提供机械支持。
- 细胞有3种类型的细胞骨架多聚体：微丝、中间纤维和微管。
- 所有的细胞骨架多聚体都是动态的，它们不断获得和失去亚单位。
- 微管是微管蛋白亚基的多聚体。
- 微管总是和产生动力的分子马达协同作用并在微管表面上运输膜泡或其他复合物。

- 纤毛和鞭毛是由微管和马达蛋白组成的特化的细胞器，它们推动细胞在液体中运动或者使细胞在液体表面移动。
- 破坏微管的药物可被用在医疗和农业上。

真核细胞的细胞质一直处于运动状态，细胞器不停地从一处转运到另一处。这种运动在大而伸长的细胞［如图 7.1（见图版）所示的神经元细胞］的细胞质中特别明显（图 7.2）。运动也发生在所有奇特类型的细胞中。细胞器的运动发挥着多种功能。分泌型膜泡离开细胞中心的高尔基体，并被运输到细胞膜上，在那里膜泡的包容物被释放到细胞外空间。同时，整合到质膜内面的膜泡被运输到内涵体中。线粒体不停地四处移动，内质网（ER）向外伸展并重新组装。在分裂的细胞中，染色体首先排列成一个面然后移动到细胞的相反的两侧。细胞器和染色体在正确的时间移动到正确的位置是通过**细胞骨架**（cytoskeleton）实现的——细胞骨架是一组蛋白质的集合，由细胞运输系统通路中的蛋白质和在其上运输的分子马达（motor）组成。

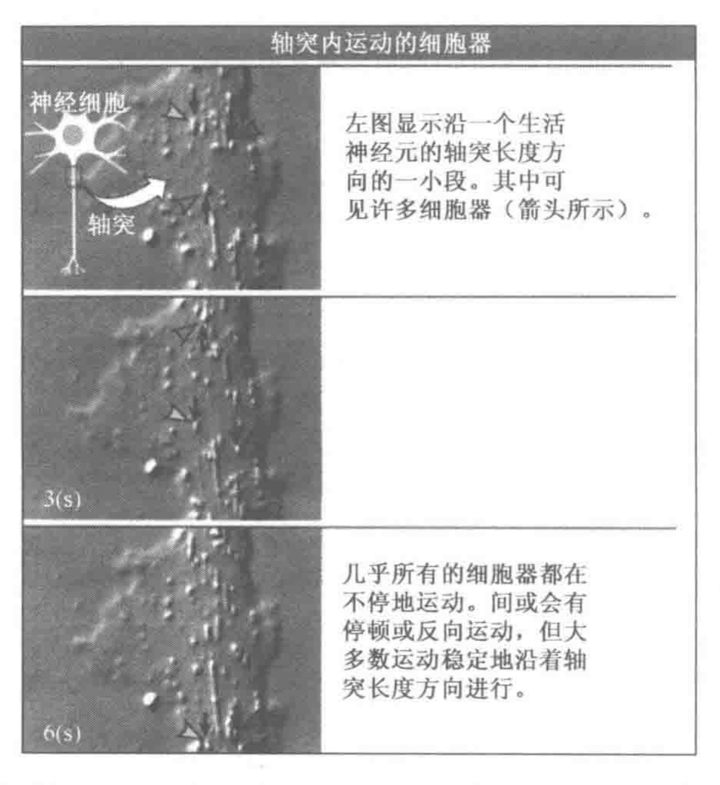


图 7.1　视频中的三张图显示活性神经元的轴突。顶图显示了整个细胞的大致轮廓。红、黄、蓝箭头表示三个膜泡，抓拍了 6s 间隔的截图。两个膜泡移向轴突的顶端，一个移向细胞体。照片由 Yale 大学的 Paul Forscher 惠赠。

细胞骨架还有其他重要功能：它为运动的细胞提供动力，并为细胞的形态提供组织和结构支持。很多类型的细胞或者在体内移动（动物细胞）或者在环境中移动（单细胞生物及有些配子）。有些细胞（如白细胞）沿着一个表面跟踪并破坏入侵的细菌；其他细胞（如精子细胞）在液体中游动以到达它们的目的地。细胞骨架驱动并引导这两种类型的细胞运动。除了在运动方面的功能外，细胞骨架还组织了细胞的内部结构，确定了上下、左右、前后的空间分化。决定细胞质的基本组织，细胞骨架决定着细胞的大体形

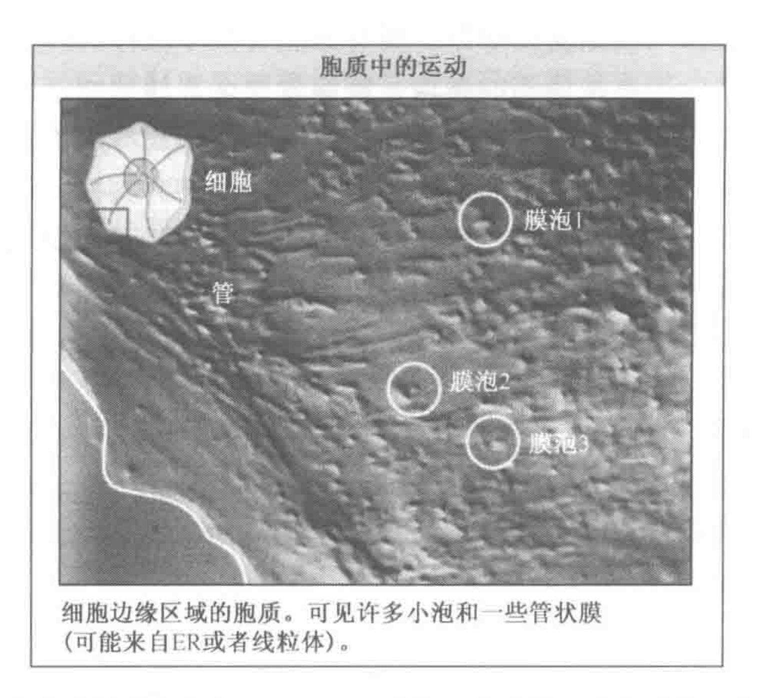


图 7.2 本图从视频中获得，显示哺乳动物细胞质的一个小区域。在左下方可见细胞边缘，细胞核在右上方屏面以外。视频显示，多数液泡是持续地运动的。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

态，使细胞可能成为方形的表皮细胞，或者形成带有又细又长的、在人体中延伸 1m 距离的轴突和树突的神经元细胞。

细胞骨架由 3 种类型的结构蛋白组成：**微管**、微丝（见第 8 章肌动蛋白）和中间纤维（见第 9 章中间纤维）。这 3 种类型的蛋白质［如图 7.3（见图版）所示］有几个共同的特点。每种结构不是以单个蛋白质分子的形式发挥作用的，而是很多相同的蛋白亚基构成的多聚体形式。就像串起来的珠子组成的一个项链，细胞骨架多聚体是由数千个

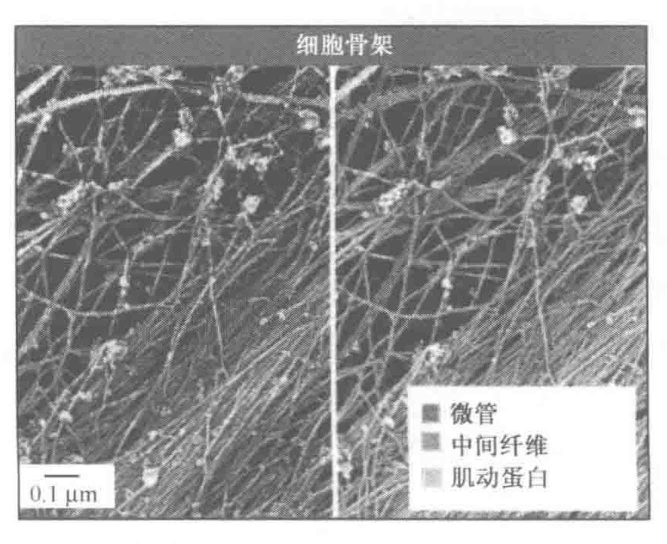


图 7.3 电子显微镜下成纤维细胞的小区域（左图）。可以看到无数的纤维。在右图中，真核细胞中存在的 3 种细胞骨架多聚体是彩色显示的，以使它们可以很容易被区分。照片由 Tatyana Svitkina 惠赠。复制自 *J. Struct. Biol.*，vol. 115，Svitkina，T.，et al.，Improved Procedures…，pp. 290-303. Copyright 1995，获得 Elsevier 许可。

蛋白亚基串连起来而排列在细胞质中的。所有细胞骨架多聚体的一个基本特点是它们不停地获得和失去亚基，而不是静态的结构。细胞骨架多聚体的动态周转使得细胞骨架能够重新自组装，以建立新的运输通路或细胞中需要改变的支撑结构。

尽管这 3 种细胞骨架蛋白有共同的特征，但每种也还有其独特的性质，使每种多聚体在细胞中更好地实现其特殊功能。在后续内容中我们会分别论述这 3 种多聚体系统，尽管它们经常在一起发挥作用。

这里我们的研究集中在微管（microtubule）。形成微管的基本亚单位是管蛋白（tubulin）。管蛋白分子相互组装形成一个直径约为 25 nm 的中空管道，这就是微管名称的来源。单根微管可能包括数万或数十万的管蛋白分子，长度可达几微米，使它能延伸到多数真核细胞一半的长度。间期的细胞常含有数百个长微管，这些微管在细胞质中延伸，把细胞的一个区域和另一个区域联系到一起，如图 7.4（见图版）所示。微管几乎总是和在其上移动的分子马达蛋白协同相互作用（见 7.12 马达蛋白是怎样发挥功能的）。这些马达蛋白和不同的“货物”（包括细胞器和膜泡）相结合，推动它们沿着微管的表面运动，很像在高速公路上的卡车运输货物一样。微管和马达蛋白还协同地发挥作用以在有丝分裂时分离复制后的染色体，而且它们形成动粒结构的核心，细胞利用这些结构游动或者在它们的表面移动液体物质（见 7.16 纤毛和鞭毛是运

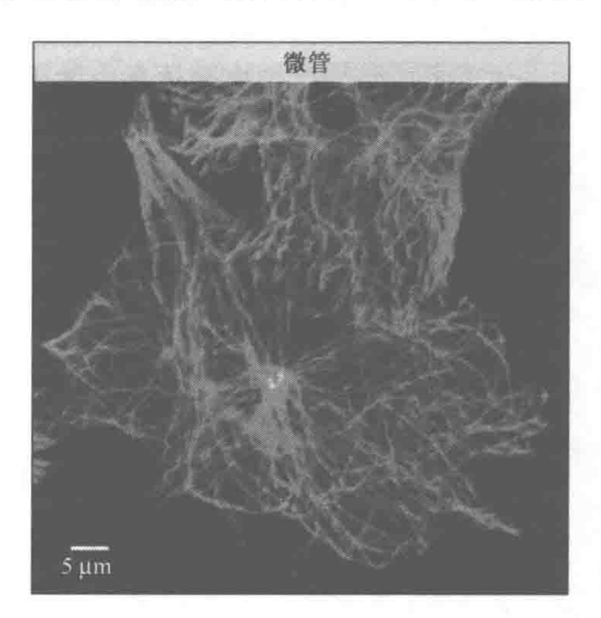


图 7.4　成纤维细胞中的微管，用荧光染料标记后观察，因此是绿色。微管从细胞中央附近的一点（红色）组织起来，并贯穿于整个细胞质。多数微管的长度足以从细胞的一部分到达另一部分。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

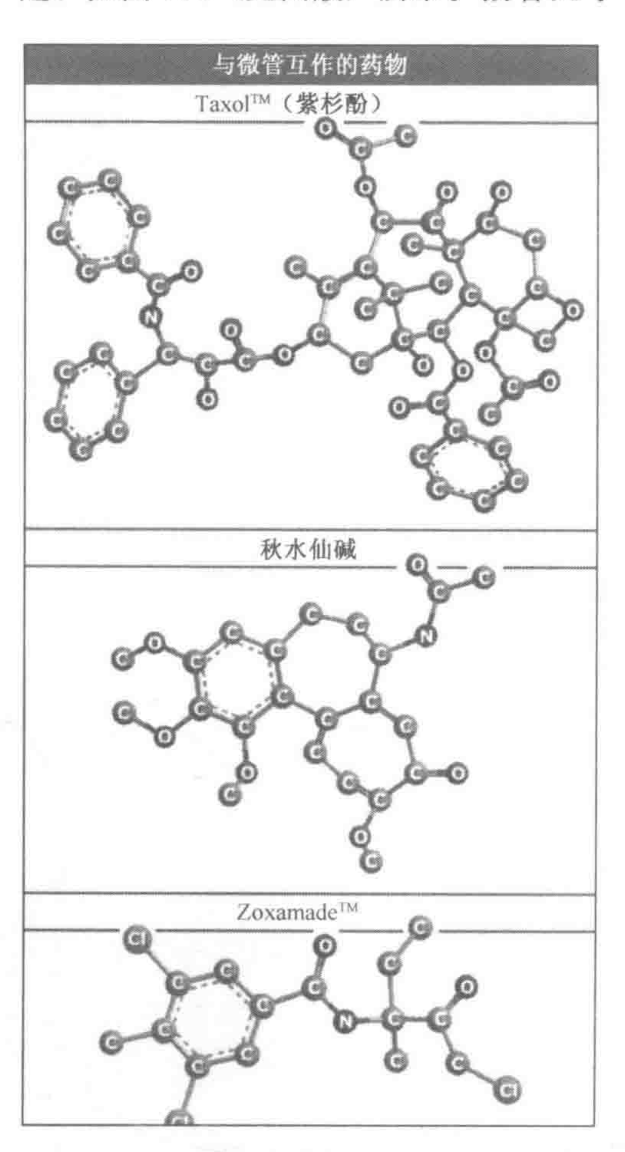


图 7.5　破坏微管聚合或解聚的 3 种有机小分子的结构。Plalitaxel（Taxol™）和秋水仙碱是由特殊植物产生的天然产物（分别是大西洋红豆杉和藏红花）。Zoxamide™是一种人工分子，通过筛选大量的能干扰微管的小分子而得到。

动的结构）。微管和马达蛋白甚至在病毒（如 HIV 和腺病毒）中被利用，这使病毒能够迅速地到达细胞核并进行复制。能够破坏微管多聚化作用的有机小分子具有医学和农业上的用处。使微管更稳定或更不稳定的药物会阻断有丝分裂，可以用来治疗癌症。其中一种药是 paclitaxel（Taxol™），如图 7.5 所示，它可以治疗卵巢癌和乳腺癌。Taxol™ 可以结合微管，通过阻止微管蛋白亚单位的解离而使微管更加稳定。秋水仙碱（colchicine）（见图 7.5）是另一种管蛋白药物，它具有相反的功能，能使细胞的微管消失。它被用来治疗痛风，因为破坏微管细胞骨架可以阻止造成这种疾病的炎症的白细胞的迁移。针对管蛋白的小分子药物在农业上也有很多用途。例如，Zoxamide™（见图 7.5）是一种杀真菌剂，可以特异性地结合真菌的微管蛋白，阻止真菌生长。Zoxamide™ 可以控制土豆的晚期枯萎病，这是造成 1985 年爱尔兰的土豆饥荒的真菌疾病。寻找有医学或农业用途的新的微管蛋白结合药物是当今该领域研究的活跃课题。

7.2 微管的基本功能

关键概念

- 细胞利用微管提供结构上的支撑力，因为微管是最结实的细胞骨架多聚体，它具有抗压作用。
- 细胞也依赖微管的动态组装和去组装以使它们能够快速重构微管骨架。
- 细胞增强或减弱微管的动力学活性，使它们能利用微管的适应性（处于动态时）或微管的结实性（处于稳态时）。
- 不同的细胞有特异的微管组织方式以适应特殊的需求。

一个简单的破坏细胞微管实验说明了这种细胞骨架成分的功能。当用药物（如秋水仙碱）处理细胞时，由管蛋白排在一起组成的微管被解聚为单个亚基（见 7.1 导言）。这些药物阻止新微管形成，引起微管骨架的持续形成和解离的不平衡。解离的微管不能被新微管取代，因而很快地导致细胞质中所有微管的消失。一般来说，当细胞的微管解聚时，细胞就失去它们的固有形态而形成球形，细胞内部的组织结构也被破坏；正常情况下作为单个结构存在于细胞核附近的高尔基体，会形成碎片并分散在整个细胞中；内质网（ER）通常是一个横贯细胞质的网状结构，由于它和核膜相连接而坍缩在核周围。如果把微管解聚药物去除，这些所有的改变就会恢复到原来的状态——微管重新形成它们原来的形式，细胞重新获得其原有的形态，内质网和高尔基体恢复到正常位置。这个简单的实验说明了微管在细胞组织、结构和运动方面的广泛功能。

微管在细胞中的功能依赖于两种看起来相矛盾的性质：微管既能以坚挺的结构元件发挥功能又很容易解离。微管的管状结构和相对较大的直径使它们相对较为坚硬而能抗压。可以认为微管和灌溉水管比较类似，能在较长距离内弯折但不被压瘪。但和水管不同，微管的动态变化比较剧烈。如果任由微管自由存在，它就会通过不停地增加或解除亚基而不断地延长或缩短。微管的缩短尤为剧烈，经常几乎涉及它的全长，使它断开甚至完全消失。微管在装配后天然地很容易解离，因此在细胞中经常有其他蛋白质来稳定并阻止它们解离。尽管看起来一个结构元件命中注定要解离比较奇怪，但这种不稳定性对于保证微管在需要时几分钟内可以解聚或重组装非常有利。一个常见的例子如图 7.6

所示，微管在有丝分裂开始时迅速重构；这种重构发生在几分钟内。另一个例子是，微管重构发生在一些正在发育的卵母细胞中。图中也说明了重构是多么广泛的事件。爪蟾的卵母细胞如图 7.7 所示，直径约为 1 mm，包含大约 50 万个平均长度为 600 μm 的微管。如果这些微管的亚单位以单个长微管的形式存在，它大约有 300 m，接近 3 个足球场的长度。不管微管的数量多么巨大，当卵母细胞受刺激而发育成熟为卵细胞时，全部的微管骨架都会在 30 min 内解聚并发生重构。

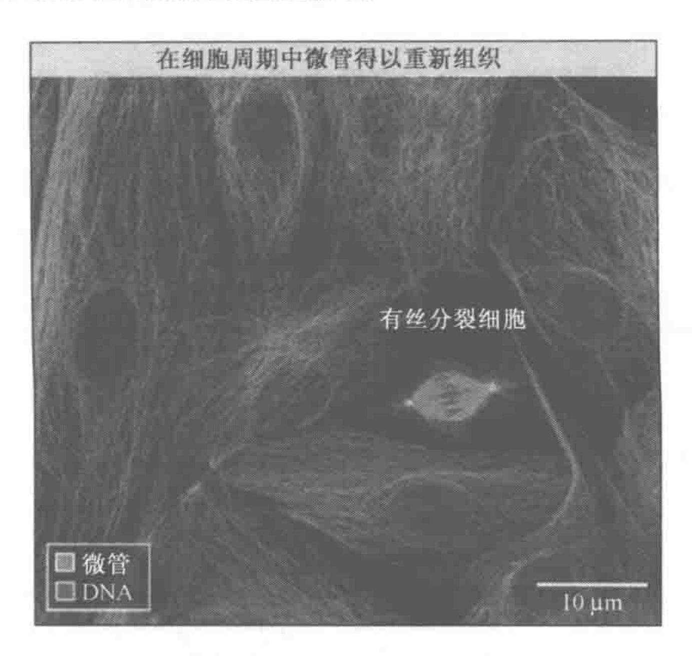


图 7.6 图中显示了约 12 个细胞，其微管和染色体通过荧光显微镜得以观察。可见被一些间期细胞环绕的一个有丝分裂细胞——其微管装配成了清晰的有丝分裂纺锤体。当细胞进入有丝分裂期时，发生了显著的微管重组织，但只不过耗时几分钟。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

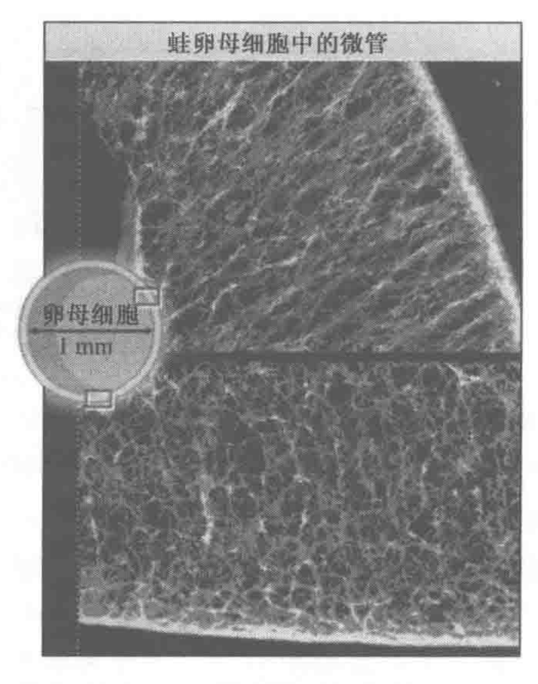


图 7.7 成熟爪蟾（*Xenopus laevis*）卵母细胞是内部包含有密集的微管的巨大细胞。这两张照片显示卵母细胞边缘两处的微管。尽管卵母细胞内存在无数的微管，而且都很长，它们还是能在几分钟内全部解散。照片由 Utah 大学的 David L. Gard 惠赠。

在一些细胞中，微管骨架的动态性质不仅使微管从一种形式重构为另一种形式，它还有其他的作用。例如，成纤维细胞必须能够在体内移动并能改变方向，它的微管以星

形状态存在，从细胞核附近的单点向各个方向发散，如图 7.8 所示。这些微管非常短命，多数仅仅存在于使细胞发生任何明显移动的一小段时间内。就算它的全部微管都解聚，成纤维细胞也还能继续移动；令人好奇的是，如果没有微管的话，它就不能转向或驾驭运动过程，这说明微管的动力学性质对于细胞改变方向是必需的。

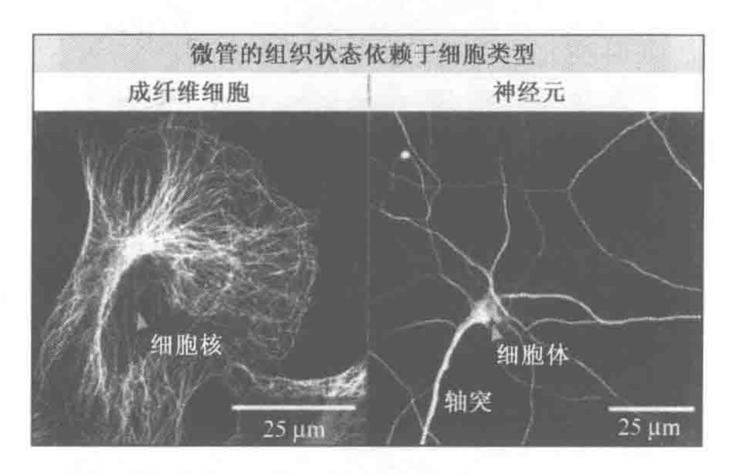


图 7.8　两种完全不同形态的细胞需要微管的不同组织形式。在人类成纤维细胞中，单个微管是可见的，它从细胞核附近的一点贯穿于细胞质；在神经元细胞中，细长、放射状的突触自细胞体长距离地延伸，其中有包装在一起的许多微管。左图由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠，右图由 Whitman 大学的 G. Withers 惠赠。

神经元细胞和成纤维细胞不仅在形态而且在行为上（见图 7.8）都大不相同，它利用微管作为强度的支撑。神经元细胞是不动的，有一个小的细胞体，细胞体上伸出跨越很长距离的、能长期存在的结构（轴突和树突）。这些结构的内部包装了平行的微管，这些微管向突触运输或从突触运走巨大数目的膜泡和其他物质。和成纤维细胞不同，在神经元细胞中微管的结构比较稳定而且为细胞的结构所必需；如果解聚，这些结构会慢慢坍缩。因而，神经元细胞利用微管的强度使它们成为稳定的结构元件。

虽然成熟的神经元细胞利用微管增加它的强度，但是一个生长中的神经元细胞对微管的动态性质也还要利用。当神经元细胞生长并与其他神经元的细胞形成突触，每个神经元细胞从它的细胞体伸出细的突起时，每个突起就会自胞体向外放射性地形成轴突和树突。在这些突起的顶端是被称为生长锥的、很活跃的动态区域，可以从图 7.9（见图版）中清楚地看到。生长锥通过长距离的运输使突触伸长，在其旅途的后面形成突触。为了协助它们移动，生长锥有和在运动的成纤维细胞中发挥相似功能的动态微管。因此，神经元细胞能够调节微管在何时及何地发挥动态特性，何时何地处于稳定状态。随着时间和空间对微管的动态周转进行调节，是所有细胞的普遍特性。

微管被组装以适应每个细胞的特殊需要。例如，图 7.10 所示的是两个具有相同形态的细胞：单细胞的裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）和一个来自非哺乳类脊椎动物（如鸡或青蛙）的有核红细胞。在两种情况下，细胞的形态都像个碟子，但微管的组织形态却大不相同。在裂殖酵母中，成束的微管向细胞尖端延伸，在那里囤积着很多新物质以备细胞的极性生长；成束的微管还把细胞核定位在细胞中心。裂殖酵母不需要用它的微管来抗压，因为它有细胞壁提供这种功能。在血红细胞中则发现微管的组织方

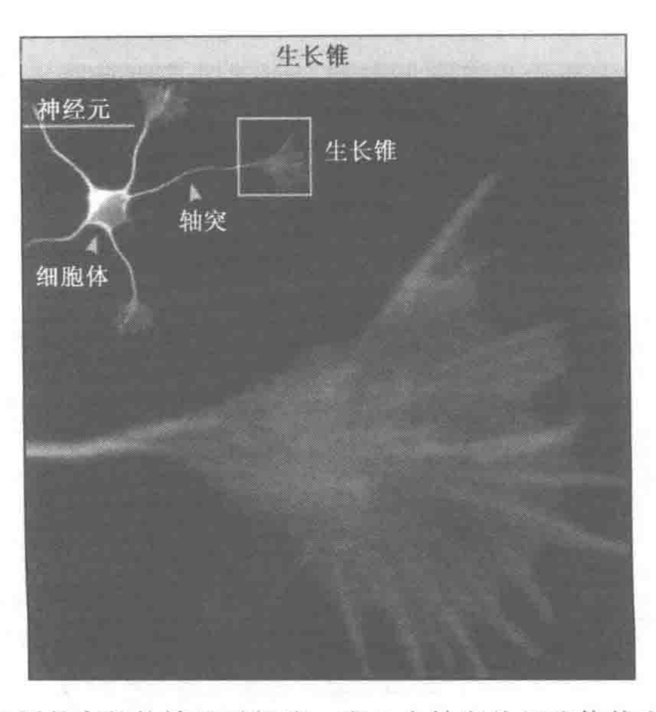


图 7.9 左上图是完整的神经元细胞，有几个轴突从细胞体伸出来。每个轴突在顶端有一个生长锥（蓝色）。向右边伸出轴突的单个生长锥被放大到主图部分。微管显示为红色，微丝显示为蓝色。照片由 Scripps 研究所的 Leif Dehmeit 博士和 Shelly Halpain 博士惠赠。

式很不相同，这种细胞和所有动物细胞相似——没有任何形式的细胞壁。这些细胞有和细胞膜相联系的微管束，存在于一种叫边缘带（marginal band）的结构中。这些边缘带微管为细胞膜提供支持力，就像哺乳动物血红细胞的锚锭蛋白（ankryin）和血影蛋白（spectrin）一样。

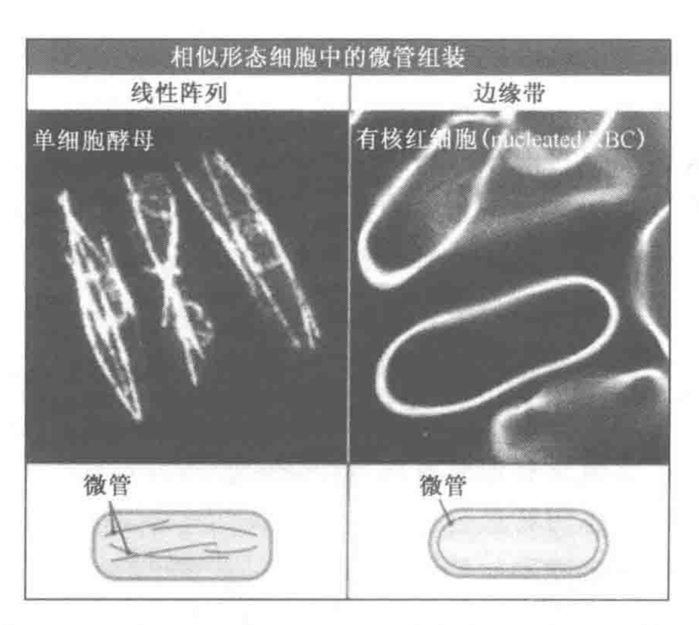


图 7.10 酵母 *S. prome*（左）有较少数目的束状微管，将细胞核定位在细胞中央，并把调节生长的因子运输到它的末端。在两栖动物血红细胞（右）中，在质膜下形成环形的带状微管束，当细胞通过毛细血管时，能帮助细胞抵抗变形的压力。左图由 Pennsylvania 大学的 Phong T. Tran 惠赠。右图由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

这些例子说明了微管骨架的基本功能，同时又提出了许多问题。微管是怎样聚合在一起并可以如此迅速地解散的？细胞怎样调节微管的动态组装和去组装？细胞中是什么因素决定了微管的组织？微管骨架是怎样产生运动的？本章将回答这些问题。

7.3 微管是由α-管蛋白和β-管蛋白组成的极性多聚体

关键概念

- 微管是由管蛋白异二聚体构成的中空的多聚体。
- 蛋白亚基连接成为 13 个线形的原纤维，它们在侧面相连形成微管。
- 在相邻原纤维元的侧链稳定了微管并限制蛋白亚基的进入或在末端丢失亚基。
- 微管是极性的多聚物，正端冠以β-管蛋白，装配得较快；负端冠以α-管蛋白，装配得较慢。

微管参与广泛的细胞功能，然而其内在的微管结构和构成它的亚基，从酵母到人类实质上都是一样的。以下的几节内容将描述微管的结构以及它们在试管中是怎样以纯化的亚单位进行装配（去装配）的。尽管微管在试管中的行为看起来和细胞中的行为可能差别很大，但体外实验对我们的理解十分关键，因为它确定了微管的基本性质和行为特征。进而，这也可以用来确定细胞必须如何组织微管并将它们利用起来。

微管的构筑元件是管蛋白。管蛋白形成了异二聚体，由两个紧密相连的蛋白质（α-管蛋白和β-管蛋白）构成。这两种蛋白质有 40%的相同序列，从没有发现它们单独存在过，而总是一分子的α-管蛋白和一分子的β-管蛋白相连在一起，构成 100 kDa 的管蛋白异二聚体。为简单起见，这种异二聚体通常被称为“管蛋白（tubulin)”，既然它总是作为一个单独的单位发挥作用的。由于α-管蛋白和β-管蛋白在形态上接近于球形，因而该异二聚体像一个花生，如图 7.11（见图版）所示。它在原子水平分辨率下的结构如下：α-管蛋白和β-管蛋白具有非常相似的结构，它们在二聚体中成线形排列，一个蛋白的前部结合在另一个蛋白的后部。

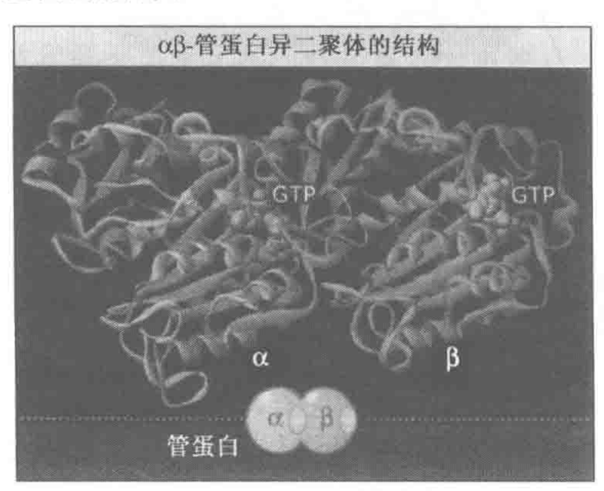


图 7.11 管蛋白异二聚体的三维结构，它们是微管的基本构成单位。金黄色和古铜色是两个蛋白亚基的多肽骨架，绿色是结合在每个异二聚体的两分子 GTP。可以看出两个亚单位结构上的相似性，它们在复合体中头尾相连。底图是一个模式图，显示本章图片中出现的二聚体的形态。图片改绘自 Nagales, E., Wolf, S. G., and Downing, K. H. *Nature*. 1998. 391: 199-203。

每一个 α-管蛋白和 β-管蛋白分子结合一个 GTP。管蛋白异二聚体的结构显示，结合于 α-管蛋白的 GTP 位于 α-管蛋白和 β-管蛋白的交界面（见图 7.11）。这个 GTP 从不水解，而且不和溶液中的核苷酸发生交换；相反，暴露在 β-管蛋白的 GTP 定位在异二聚体的一端，在那里它可以和溶液中的核苷酸发生交换（见图 7.11）。在微管组装时，结合于 β-管蛋白的 GTP 水解成 GDP；GTP 水解成 GDP 导致管蛋白异二聚体构象的变化，这种变化在微管的动态周转中发挥着重大的作用。

微管是由数以千计的管蛋白亚基组成的蛋白多聚体，形成了中空的管。典型情况下，微管由相互延长轴平行排列的 13 根蛋白亚基线性链搭建而成；每一个线性链叫做一根**原纤维**（protofilament）。这些原纤维（如图 7.12）在侧面相互连接，就形成微管。尽管可能形成 11～15 个原纤维组成的微管，但细胞中发现的大部分微管都有 13 根原纤维。带有 13 根原纤维的微管的直径是 25 nm，大约是它的壁的厚度的 5 倍。

管蛋白异二聚体在原纤维的纵向上首尾相连（见图 7.12）。在大多数毗邻的原纤维中，α-管蛋白和 α-管蛋白相邻，β-管蛋白和 β-管蛋白相邻。由于毗邻的原纤维相互间略微有些对接错位，因此表现出一处不连续性，或者说有一个狭缝，在那里一个原纤维的 α-管蛋白和另一个原纤维的 β-管蛋白相毗邻。很可能这个狭缝反倒对微管组装发挥了重要作用。

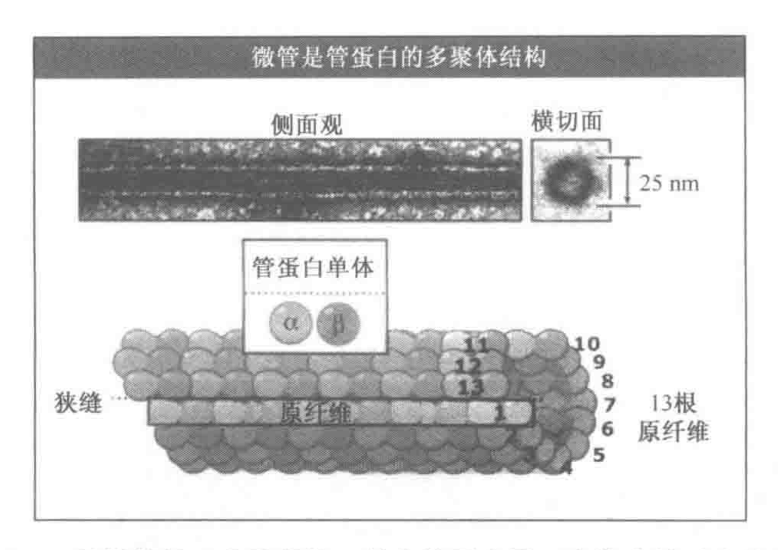


图 7.12　一根微管的一小段结构。单个管蛋白异二聚体末端对末端地排列在原纤维中，原纤维通过边靠边的相连方式组织成中空的管子。所有的异二聚体都有同一个取向，其中 α 亚单位朝向微管的一端，而 β 亚单位则朝向另一端。顶图是由纯化的管蛋白装配的微管在电镜下观察到的图像。左图由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠，右图由 Duke 大学医学院的 Harold Erickson 惠赠。

在一根微管内，每个微管蛋白异二聚体与相邻的异二聚体形成广泛的非共价化学键。如图 7.13 所示，这些非共价键不仅在纵向上形成，也在侧面形成，连接了相邻的原纤维。在纵向上的键能比在侧面的键能要高，但是正是无数个侧面键的存在提高了多聚体的强度。这一点很容易说明。在单个分离的原纤维中，亚基键只有纵向键，这些键有相同的强度，因此它们有相同的断裂可能性。这使单个原纤维容易断成片段（见图 7.13）。在微管中，多聚体中部的亚基往往也形成与毗邻亚基相连的侧向键。为使微管

断裂，其所有 13 根原纤维必须同时在同一位置失去纵向上的键合。由于这一点很难发生，所以微管的断裂也很罕见。

由于微管中亚基间侧向键的存在使得微管中部的二聚体很难从多聚体中失去键合，因为从微管中部释放一个二聚体需要同时打断好几个键。相反，亚基只在纤维末端增加或减少，在那里每个亚基以较少的键与微管的其他部分相连（见图 7.13）。

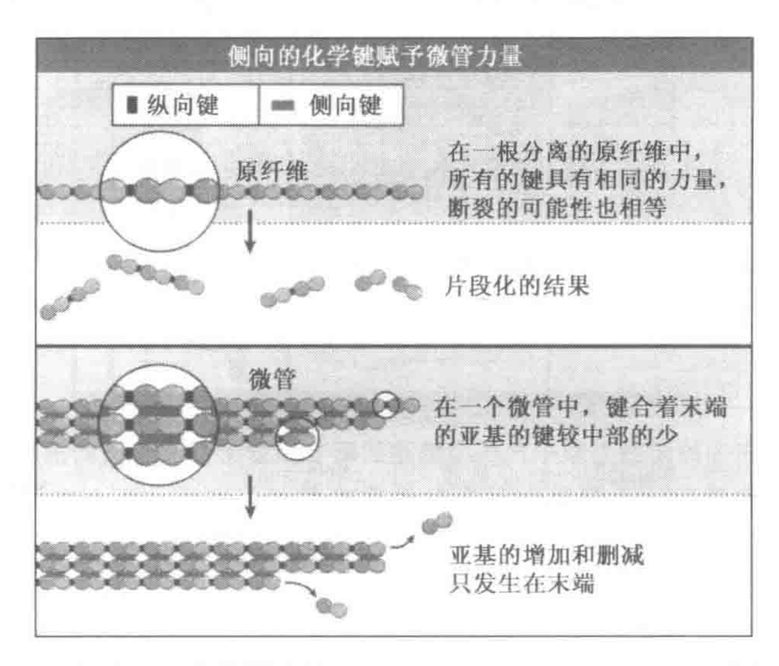


图 7.13　管蛋白异二聚体既形成纵向键（沿着微管的纵向）也形成侧向键（相邻的原纤维中的亚单位之间的键）。单个原纤维容易解离成片段，因为所有的键有同样的强度，也有相同的断裂可能性。在微管中，侧面键的存在使多聚体在中部不容易断裂。亚基的增加和减少只在末端进行，与微管中部相比，在端部每个亚单位受到较少的键的维系。为清晰起见，这里只显示 3 根原纤维。

纯化的管蛋白异二聚体会自发形成微管所必需的侧向键或纵向键，因此，微管的组装是一种**自组装（self-assembly）**过程，其中形成最终结构的信息都储存在它的亚基中。其他自组装的例子还有微丝纤维多聚化和一些病毒外壳组装。

微管中亚基的排列使微管两端有区别（见图 7.12）。在每根原纤维中每个管蛋白异二聚体有同样的方向，而且在每个微管中所有原纤维也有同样的取向。因此，β-管蛋白暴露在微管的一端（称为正端），而在另一端则有一圈暴露的 α-管蛋白（称为负端）。这种组织方式给微管带来两个十分重要的性质。首先，它的两端结构是不同的，因此行为也不同。就像我们将要看到的，细胞经常利用这一特点，例如，通过对微管两端的装配进行独立的调节来保证这种特点。其次，每个微管都有极性取向（即内在的方向），因此可以认为它指向一个方向或另一个方向。这种极性存在于整个微管，而不仅仅是它的末端。只要观察微管表面的任何一点，甚至是远离任何一端的位置，就能够辨别哪个方向延伸至正端，哪个方向延伸至负端。微管的极性可以使它们成为分子马达蛋白的有向的轨道，而且这种极性对于微管和马达蛋白发挥组织细胞内部结构的功能是必需的。

在细胞中，微管在极性方面是具有高度组织性的，如图 7.14 所示。例如，在微管呈放射状排列的成纤维细胞或其他细胞类型中，所有的微管在细胞的中心形成负端，在细胞周边形成正端；在上皮细胞中，微管相互平行排列，从细胞的顶部延伸到细胞的底

部，并且总是正端在细胞底部，负端在细胞顶部。相似的，轴突中的所有微管也指向同一个方向。在任意一种情况下，微管排列的极性对于细胞的组织结构和功能都是必需的。

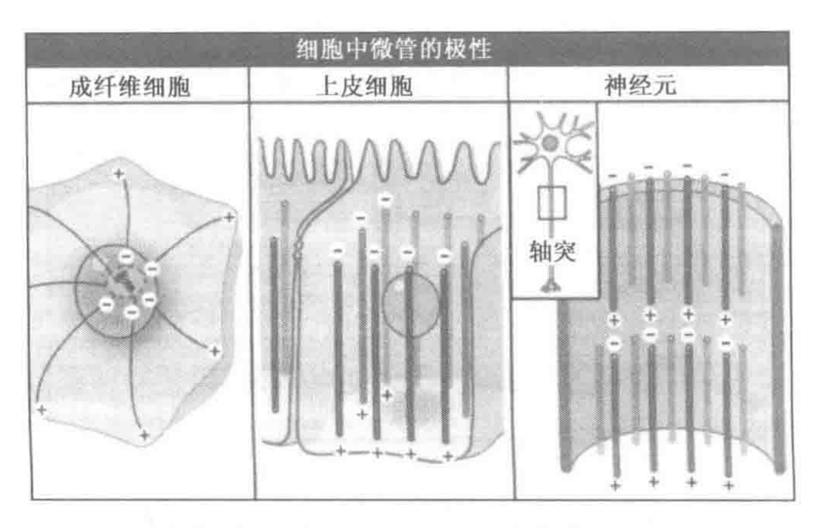


图 7.14　在 3 种细胞类型中，每个细胞的所有微管都具有相同的极性，这就使微管的极性被用于细胞质中对方向的准确指示。例如，在上皮细胞中，由“+”向“−”的方向是向“上”的。细胞的形态以及细胞表面或内部区域的特异化取决于微管的极性。

7.4　纯化的管蛋白亚单位能组装成微管

关键概念

- **微管的多聚化起始于一些小核心的形成（小多聚体）。**
- **微管通过在两端加入管蛋白亚基而实现多聚化。**
- **溶液中管蛋白亚基总是保持临界浓度，管蛋白浓度必须在临界浓度以上才能发生组装。**

微管通过管蛋白亚单位的多聚化而形成。通过用纯化的管蛋白做体外实验可以研究这个过程。为形成微管，首先将管蛋白和 GTP 混合在合适的缓冲液中，然后把溶液加热到 37℃以引发多聚化（针对哺乳动物管蛋白）。微管的形成可以很容易地通过光散射检测到，这是因为所组装的多聚体能散射光线，而单个管蛋白则不能。散射光的量同微管多聚体的量呈正比关系。

微管多聚体的形成与时间的关系曲线如图 7.15 所示。起始时，有一个检测不到多聚体的滞后期。接着，多聚体形成，它的量呈线性上升趋势直到平台期。检测不到多聚体的起始阶段称为自发成核期（spontaneously nucleation phase）。在这个起始滞后期中，由很少的微管蛋白亚基组装成的小核心开始形成，如图 7.16 所示。这些小核心不稳定，因为相对于获得更多亚基来说它们更易解聚。然而，有些小核心在大小上却有所增大。一旦结合了足够数目的亚基（6～12 个），小核心就会变得稳定，因为它更容易增长而不是解聚。因为形成足够大的核心比较困难，成核过程是微管多聚化的限速阶段。为了避免自发成核缓慢的限制，细胞利用特殊的蛋白复合体加速成核过程并确定成核地点。

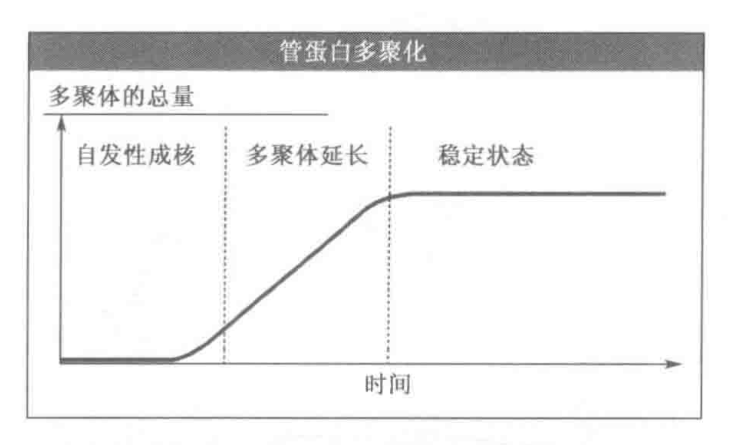


图 7.15 本图显示纯化的管蛋白在体外聚合成微管多聚体的量随时间发生的变化。起初检测不到微管，接着多聚体的量随时间呈线性增长，然后又进入平台期。在这 3 个时期中，发生着不同的分子事件。

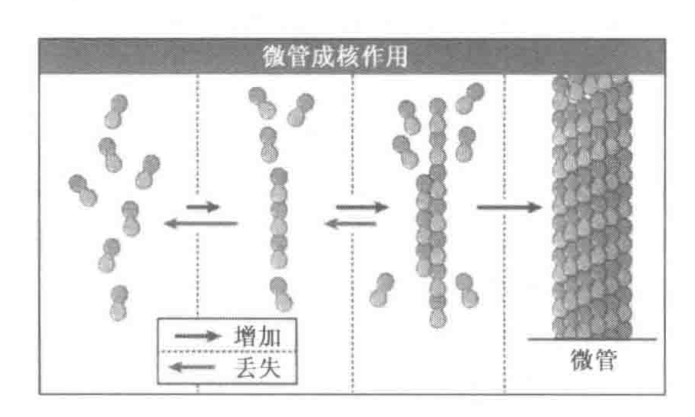


图 7.16 微管成核作用的简单图示。少量的二聚体可以结合起来，但这种复合体通常会解离。然而在很少情况下，会结合更多的二聚体，它们相互间边靠边地相连接。一旦形成了 6～12 个二聚体的复合体，它就倾向于继续增长。一小片原纤维最终闭合成为一个短微管，常称为“微管种子”。

在多聚体的量呈线性上升的时期，管蛋白亚基结合在自发成核时期形成的微管种子（即微管核心）上。每个管蛋白通过在它的正端和负端结合管蛋白亚单位而得以延长。亚单位也从末端解离，但是它们流失得较少，而更多的是结合在末端上。净结果是亚基的增加，如图 7.17 所示。微管净延长的速率依赖于亚基结合和失去的速率，如方程 7.1 所示：

$$dP/dT = k_{on}[\text{tublin}] - k_{off} \quad (\text{方程 } 7.1)$$

其中 dP/dT 表示单位时间内形成多聚体的数量，[tublin] 是管蛋白分子在溶液中的浓度，k_{on}是亚基增加速率常数（单位是 $mol/L^{-1} Sec^{-1}$），k_{off}是亚基流失速率（单位是 Sec^{-1}）。由于正端和负端的速率常数是不同的，所以方程 7.1 必须针对多聚体的某一端。正如方程 7.1 所示的数学关系一样，在较高的管蛋白浓度下，微管的多聚化速率较高。

最终，微管多聚体的量会在系统达到稳定状态时达到一个最大值，此时亚基的失去和捕获是平衡的。当多聚体形成最大量时，还有很多管蛋白亚单位依然存在于溶液中。在溶液中的亚单位浓度被称为临界浓度（C_c），而且不管起始的管蛋白浓度是多少，最

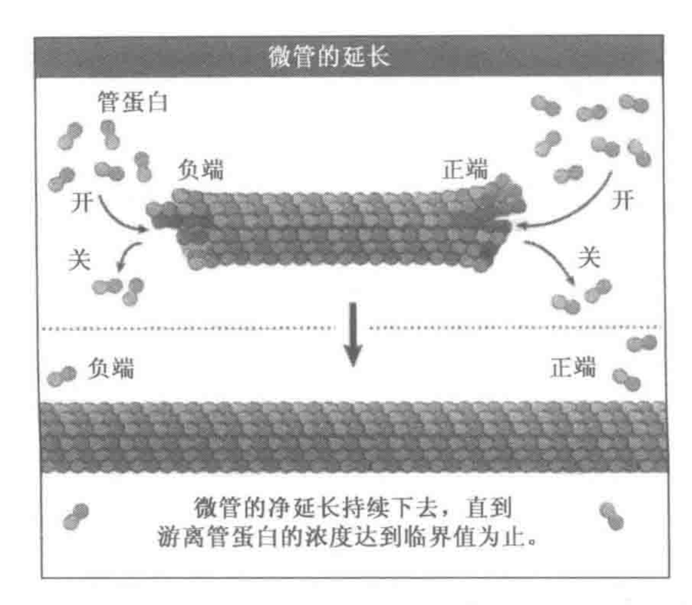


图 7.17　当微管种子形成以后，微管通过在它的两端增加亚单位而得以生长，一端生长得比另一端快。这种生长模式导致在自发成核阶段之后，多聚物总量的线性增长。

终的管蛋白浓度都是相同的。如果用数学关系来描述该临界浓度的话，就会很容易明白这一点。在稳态时，没有多聚体的净装配，所以方程 7.1 的 dP/dt 等于 0。如方程 7.2 所示，我们可以求出当 dP/dt 等于 0 时［tublin］的值：

$$[\text{tublin}] = C_c = k_{on}/k_{off} \quad \text{(方程 7.2)}$$

对于纯化的管蛋白，其临界浓度大约是 7 μmol/L。既然亚基的浓度在稳态的溶液中总是不变的，因此多聚体的装配必须在管蛋白二聚体浓度高于临界浓度时才能实现。相似的，如果管蛋白二聚体在稳态时被稀释，因此管蛋白的总浓度降低了，多聚体会开始解聚，多聚体的量就会减少。这种减少会在可溶性管蛋白亚单位的浓度重新达到临界值时停止。因此，临界浓度可以被看作是微管装配所需的最小浓度。

一个重要的问题是，当达到稳态时在单个的微管上发生了什么？其中一个（最简单的）可能性是，就像许多化学反应一样，此时微管的多聚化达到一个真正的平衡，每一个微管的两端都和溶液中的管蛋白分子保持平衡。如果是如此，在稳态下只应有很少的微管和溶液中的亚单位交换，其原因将很快论述（见EXP：7-0001）。然而实验证据却恰好相反，在稳态时微管失去或获得亚单位是广泛存在的，比根据平衡态交换所预测的要更广泛。这说明一定发生了比简单的平衡态更有趣的变化。有关增强的交换和多聚体周转的机制对于了解微管的行为是个基本条件，这将会在下一节论述。

7.5　微管通过一种独特而有条件的动态不稳定过程进行组装和去组装

关键概念

- 微管不停地的在生长和缩短两种状态中转变，这一过程被称为动态不稳定性（dynamic instability）。
- 从生长状态到缩短状态的转化被称为一次灾变（catastrophe）。
- 从缩短状态到生长状态的转化被称为一次回补（rescue）。

- 微管群体的生长和缩短是不同步的；在任何时候，多数微管在生长，少数在缩短。
- 正在生长和缩短的微管末端的结构是不同的，生长的末端有原纤维的延伸，而缩短的末端卷曲的原纤维从微管表面结构纹路上翻出来。

理解微管多聚化动态和动力学问题的体外实验最初是利用光散射法之类的技术，这样的手段只能检测任意时间存在的多聚体总量。在20世纪80年代中叶，相关领域引进了用免疫荧光或电子显微镜跟踪微管多聚化过程的方法。和光散射技术不同，这些技术可以观察到多聚化反应中的单个微管。微管可以被计数，长度可以被测量。得到的结论出人意料也极为有趣，为多聚体为什么得失管蛋白亚单位的数量比根据平衡交换所预测的交换量要多得多的问题提供了答案（见EXP：7-0002）。对于微管的多聚体平衡情况，一旦达到稳态，它们在长度上就只有微小的改变，而且微管的总数随时间不会有显著的变化。然而用新方法清楚地发现，在稳定状态（图7.15的平台期）时，微管的长度和数目都是变化着的。在大约40min时间内，有些微管的长度增长了10倍之多，同时微管的总数目却在减少。另有检测从中心体（稳定的成核位点，见7.7 *细胞利用微管组织中心以成核的方式启始微管的组装*）起始聚合的实验获得了出乎意料的结果。微管首先获得条件从中心体开始多聚化；接着，样品稀释到刚好在临界浓度以下。根据平衡多聚体得出的结论应当是：微管迅速开始解聚，直到重新建立起临界浓度。但事实是相反的，当有些微管解聚时，其余的微管却继续多聚化，这对于平衡多聚体来说是不可思议的。这些研究以及其他一些探索的结果产生了一个模型，称为**动态不稳定性（dynamic instability）**，在这种情况下微管存在于或者生长、或者缩短的持续相位中，在两种相位间发生陡然转变。这种陡然转变，当从生长转为缩短时称为灾变（catastrophe），当从缩短转为生长时称为回补（rescue）。

用光学显微镜对生长和缩短的微管进行观察分析，证实了这种动态不稳定模型。图7.18显示了这种类型的实验。这些实验证明，一根单一的微管在几微米长度的时候会稳定地增长，接着就发生灾变，迅速缩短。微管可以回补和恢复生长，也可以完全解聚。图7.19显示了两个微管在生长和缩短时相间发生转换的动态记录录像。图中两个微管从一个稳定的结构（鞭毛轴丝的短片段，一个由稳定微管组成的细胞器）开始成核，其中一个在正端生长，另一个在负端生长。这种技术使人们对微管的正端和负端的动态多聚化都能跟踪。这种实验显示微管的正端比负端生长得快。微管的正端也会更频繁地发生灾变，使它们成为微管的更为动态的一端。

动态不稳定的确定属性是延长相和缩短相的持续存在，以及这两种状态间的迅速转换。因为灾变和回补以随机间隔发生，一组微管中单个微管的行为是均一和不同时的。多数微管会缓慢地生长，但同时有少量的微管在迅速地解聚。单个微管不会达到一种稳态的长度；相反，每个微管总是在变得更长或更短一些。

生长中和缩短中的微管在末端的结构上是不同的。在多聚化时，如图7.20所示，微管的末端经常有片层状的延伸，其中有些原纤维比其他的长得更长，亚基只和原纤维末端结合。在每个原纤维延伸的时候，亚基和相邻的原纤维形成侧向键，最终使片层围成微管的管状形态。当微管解聚时，单个原纤维从微管表面的结构纹路上剥离。在单个卷曲的原纤维中，亚基间只通过纵向键结合在一起。如上述所讨论（见7.3 *微管是α-管*

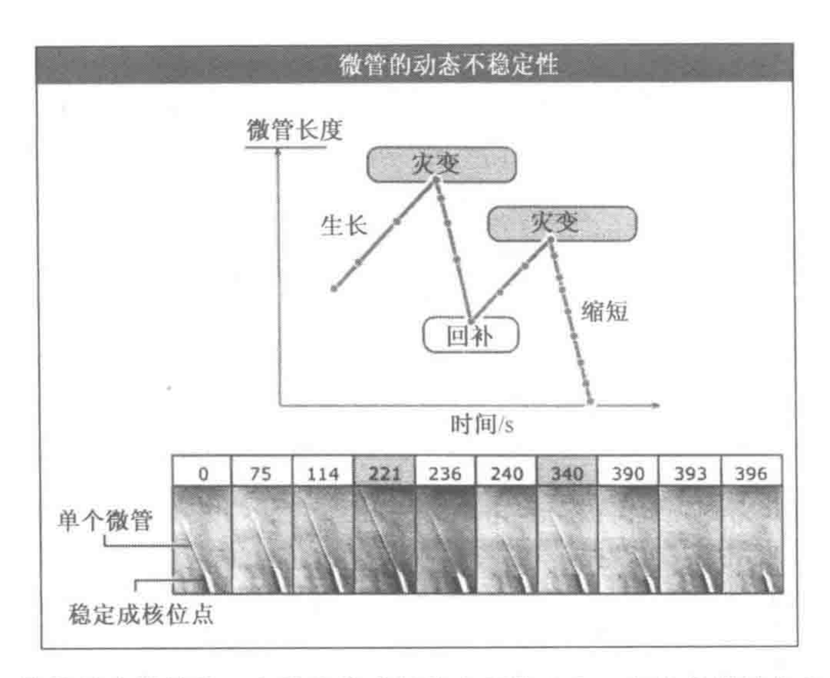


图 7.18　体外单个微管从一个稳定的成核位点延伸出来。它的负端结合在成核结构中，正端则是游离的。微管的长度用视频显微镜随时间而记录，并在上面做出曲线图。微管首先是生长，然后突然开始缩短。当长度快缩短完时，它又重新生长。很短时间后，它又经历了第二次灾变，这一次它完全地解聚。可见微管的数次解聚和它的聚合一样快。视频中的每一屏以秒来记录。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

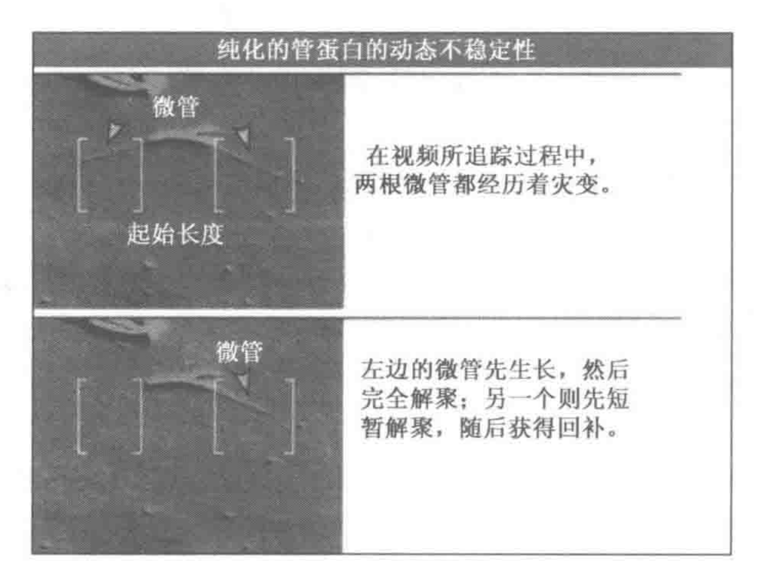


图 7.19　鞭毛轴丝（axoneme）的一小段被用于纯化的管蛋白体外聚合的稳定成核位点。这里显示了视频中的两张图。在上图中，单个微管自轴丝的每端发生多聚化。左边微管的正端是游离的，右边微管的负端是游离的。在上图和下图的视频间隔时间里，左边的微管完全解聚，右边的微管解聚了一小段又重新生长起来。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

蛋白和β-管蛋白组成的极性多聚体），在单个原纤维中亚基间的键都有同样的断裂可能性，这导致剥离出的原纤维迅速地解聚，或通过其两端的亚基解离，或通过其他位点亚基的破坏。

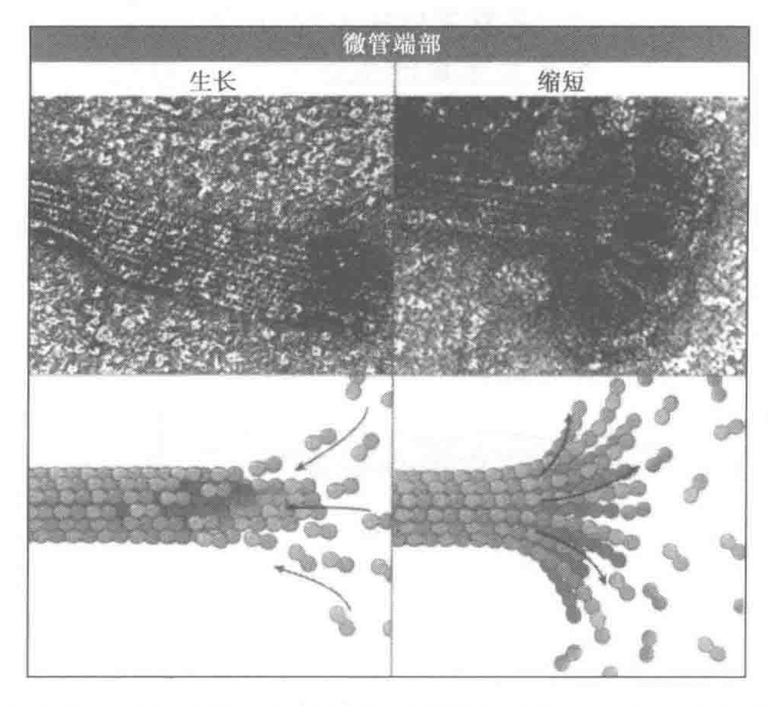


图 7.20　上图是生长和缩短中的微管的正端的电镜图。在生长的微管的顶端一侧伸展出较长的原纤维。这些原纤维向着电镜下微管附着的表面平铺着，结果在末端出现了一张平整的原纤维片层。在缩短的末端，原纤维从微管壁中剥离，并向后卷曲。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

7.6　GTP-管蛋白亚单位组成的帽状结构调节微管的动态不稳定转化

关键概念

- 在生长的微管顶端有 GTP-管蛋白帽，因为与 β-管蛋白结合的 GTP 会在亚基添加在微管上时迅速地水解为 GDP。
- 微管的主体部分由 GDP-管蛋白组成。
- GTP 的水解伴随着管蛋白二聚体结构的改变。
- GTP-管蛋白形成直挺的原纤维，它和相邻原纤维亚基保持接触，并使这些原纤维持续生长。
- GDP-管蛋白从微管中卷起，打断了与相邻亚基间的侧向键，引起原纤维的剥离。

由于管蛋白的结合及 GTP 的水解，动态不稳定性是可能的。通过动态不稳定性进行的微管组装和去组装是一个不平衡过程，这个过程需要能量输入，能量由 GTP 水解提供。当管蛋白异二聚体整合入微管后，β-管蛋白把它结合的 GTP 水解为 GDP。水解过程不是立即发生的，而是稍微滞后于多聚化过程。因此，生长中微管的核心是由 GDP-管蛋白组成的，但其末端冠以 GTP-管蛋白。

在微管末端的 GTP-管蛋白调节着动态不稳定性，决定了微管是生长还是缩短，如图 7.21 所示。缩短中的微管失去了 GTP-管蛋白帽，在多聚体的末端裸露着 GDP-管蛋白亚单位。是 GTP 还是 GDP 与微管末端的亚基相连，决定了它们的解离速度。GDP-

管蛋白从微管上解离的速度比GTP-管蛋白快大约50倍。因此，GDP-管蛋白暴露在微管末端会导致迅速的解聚。灾变是生长的微管失去其GTP帽的结果，而回补需要GTP-管蛋白重新结合在缩短中的微管末端（见图7.21）。

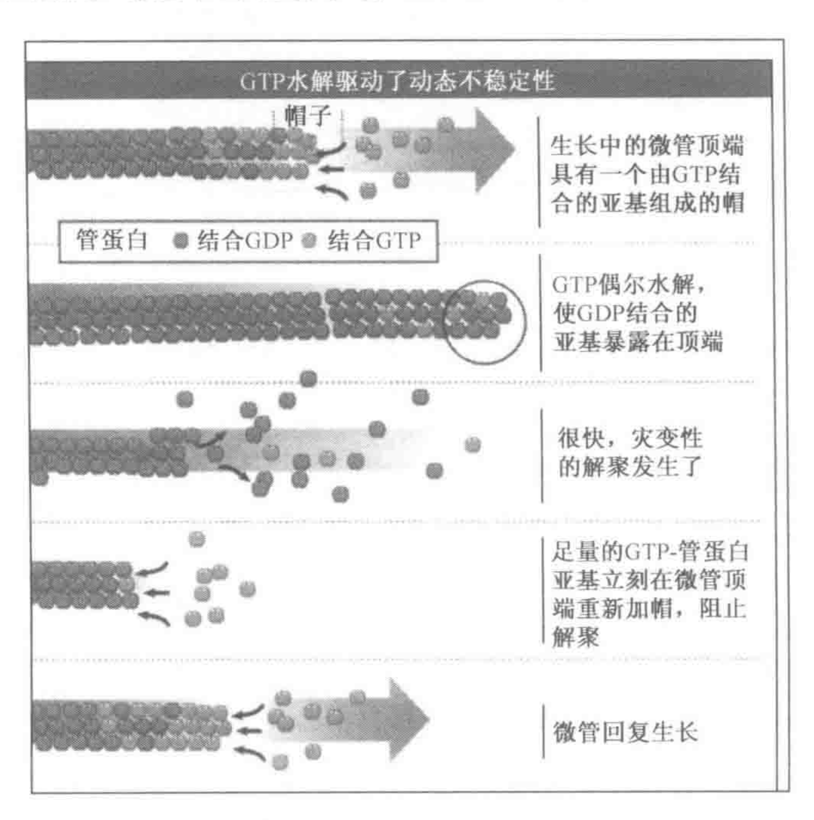


图7.21 动态微管末端事件的模式图。当管蛋白二聚体结合到微管上后，结合在β-管蛋白上的GTP很快就发生水解，造成生长着的微管末端产生由GTP-管蛋白亚单位形成的小帽。只要该帽子存在，微管就会生长。然而，如果GDP结合的亚单位一直暴露于末端，微管就会开始迅速地解聚。如果当解聚时GTP-亚单位结合上去，微管就会发生回补。解聚发生得非常迅速，而回补则很少发生，所以在实现回补前，大部分微管都会解聚。

在微管末端存在的GTP和GDP微管蛋白通过改变微管末端的结构而调节微管聚合和解离的速度。结构研究表明，GTP-管蛋白形成挺直的原纤维，而GDP-管蛋白以弯曲的原纤维形式存在更为稳定，这和解离的微管末端的弯曲的原纤维相似，如图7.22所示。因此，微管末端管蛋白的GTP和GDP结合状态决定了末端的结构，而末端的结构决定了微管是增长还是缩短。GTP-管蛋白帽使原纤维变直，并阻止微管核心中的GDP-管蛋白放松到其所倾向于形成弯曲的构象。然而，如果GDP-管蛋白核心一直暴露于微管的末端，GDP-管蛋白能够打断与相邻亚基间的侧面键，则原纤维就会从微管中心翻卷出来（见图7.22）。这些弯曲的原纤维在随机的位点断裂，片段会解聚成单个的亚基（见图7.22）。

GTP帽是怎么产生的？微管是怎么失去它的？我们目前还不知道GTP帽有多大，但知道它相当小（小于200个亚基），可能像一个单层亚基的厚度。帽子的存在需要管蛋白在进入多聚体不久立即水解GTP，但也只能在有另一个管蛋白分子结合在同一根原纤维后进行水解。一种可能的机制是，这可能取决于微管蛋白的结构以及它在何处结合GTP。在微管正端，β-管蛋白的GTP暴露在微管末端。图7.23显示，当一个新的管

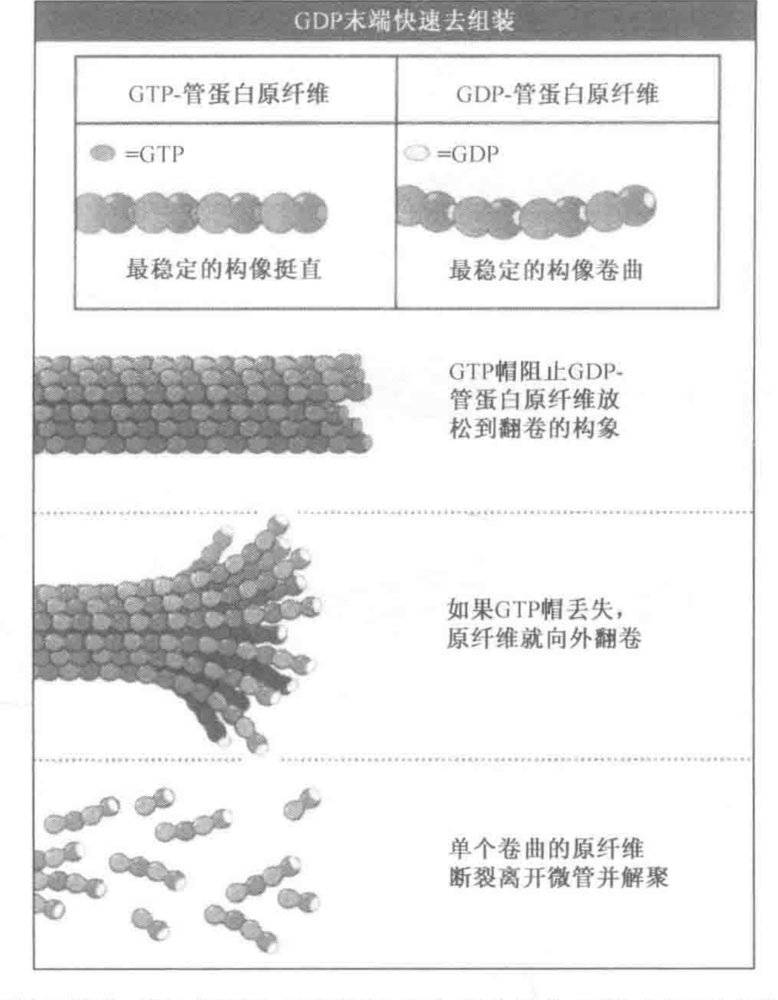


图 7.22　微管末端的 GTP 帽使构成微管的其余部分的含 GDP 原纤维变直。一旦失去 GTP 帽，原纤维就会放松成它们更稳定的卷曲构象。当它们弯曲时，原纤维相互分离，使它们更容易断开。图上方显示了和每个 β 亚单位相结合的核苷。为简单起见，在下面的三个图中只显示了每个原纤维末端的亚单位所结合的核苷。

蛋白异二聚体结合在末端后，它的 α-管蛋白同这个 GTP 发生接触，这被认为会引起它的水解（见STRC：7-0001）。在这种情形下，GTP 帽总是保持一个亚基的厚度，既然每个新增的亚基都会刺激由微管中它下面亚基催化的水解。如果这一论断是正确的，那么 GTP 帽怎么总是失去呢？其中一种途径可能是通过 GTP 亚基从多聚体末端解离；另一种可能途径是通过末端亚单位自发催化的 GTP 水解——这一过程相对于受到另一管蛋白刺激而水解的速度要慢得多。目前还不知道整个末端结构开始剥离并缩短所需要裸露的带 GDP 帽的原纤维数目。

一个正在缩短的微管——其原纤维剥离了出来——怎样回复到生长状态（即回补）？GTP-管蛋白很容易结合在原纤维的末端，即使当它们剥离出来处于缩短过程中时。但是，GTP-管蛋白结合在剥离的原纤维上并不能稳定其末端，因为它不能和它相邻的管蛋白形成侧向的键。回补过程很可能需要一些剥离的原纤维在微管壁附近折断，以使一些 GTP-管蛋白进入与别的亚基形成侧向键并稳定末端。

描述灾变和回补的分子模型可能说明上述事件是不大可能发生的。事实上，它们是可能的。灾变和回补同微管末端亚基的加入和失去相比更为罕见。对于成纤维细胞中正

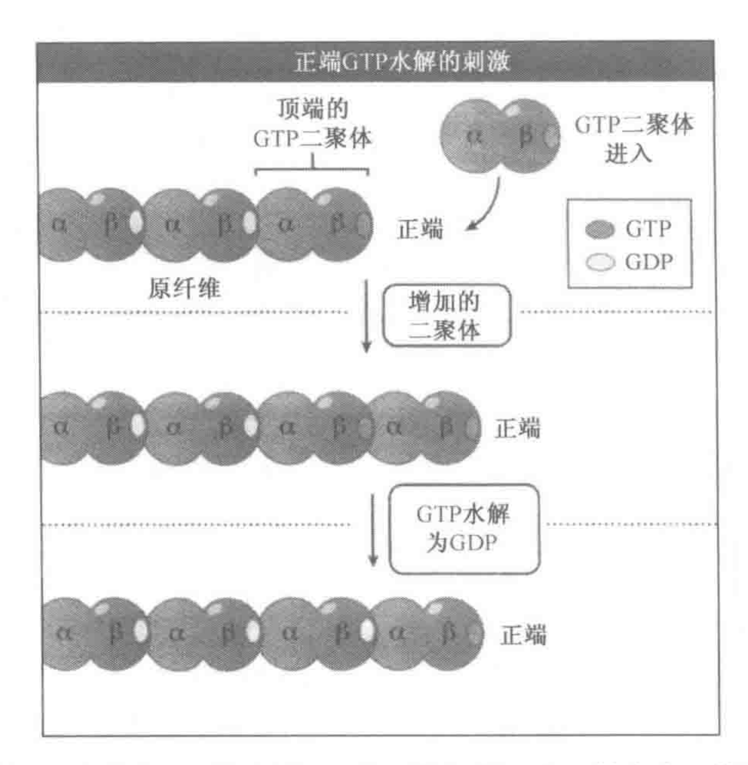


图 7.23　在微管末端产生 GTP 帽的一个可能机制。由于结合在 β-管蛋白的 GTP 位于微管蛋白异二聚体的末端，最后一个二聚体的 GTP 就暴露在原纤维的末端。新进入的二聚体的 α-管蛋白和 GTP 接触，可能引起它水解。这一机制会保留一个仅含单层亚单位的 GTP 帽。

在解聚的微管，在回补发生前大约有 11 000 个亚基解离。灾变和回补的罕见使得多轮的多聚化和解聚能发生在微管的大部分范围，有时甚至完全解聚。我们将会看到，微管在很长范围内持续生长和缩短的能力对于它们在细胞内发挥功能是必需的。

7.7　细胞利用微管组织中心以成核的方式启始微管的组装

关键概念

- 在细胞中，微管组织中心使微管通过成核作用而形成。
- 微管组织中心的位置决定了细胞中微管的组织。
- 中心体是动物细胞中最常见的微管组织中心。
- 中心体由环中心粒基质所包围的一对中心粒组成。
- 环中心粒基质包含 γ-管蛋白；是 γ-管蛋白质和其他一些蛋白质一起发挥了微管成核作用。
- 运动的动物细胞包含另一种微管组织中心，称为基体。

在前节，我们看到了纯化的管蛋白怎样装配成微管：微管首先成核，然后通过增加或减少亚基来生长或缩短。这些事件在细胞内以同样的顺序发生，但细胞是利用一种特殊的细胞器——**微管组织中心（microtubule-organizing centre，MTOC）**来起始微管组装的，微管组织中心能使微管成核。由于自发的成核非常缓慢，细胞的几乎所有微管都在微管组织中心处成核。由它的名字可以看出，微管组织中心在细胞中也组织微管，它们经常和微管的负端相联系。它们使微管成核，因此决定了微管的位置和方向。

在动物细胞中，最常见的微管组织中心是**中心体（centrosome）**，如图 7.24（见图版）所示。中心体由一对**中心粒（centriole）**组成，中心粒由**环中心粒物质**围绕着。中心粒是桶形的小细胞器，在中心体的中心相互形成直角。中心粒由少见的称为三联体的微管结构组成，9 个三联体对称地形成桶壁。每个三联体微管包括一个完整的微管（A 管）和两个部分微管（B 和 C 管）。除了 α-和 β-管蛋白外，中心粒还包括微管超家族的另外两个成员，δ-和 ε-管蛋白。管蛋白不是中心粒和环中心粒基质的唯一成分，至少有 100 种不同的蛋白质构成了这些结构。

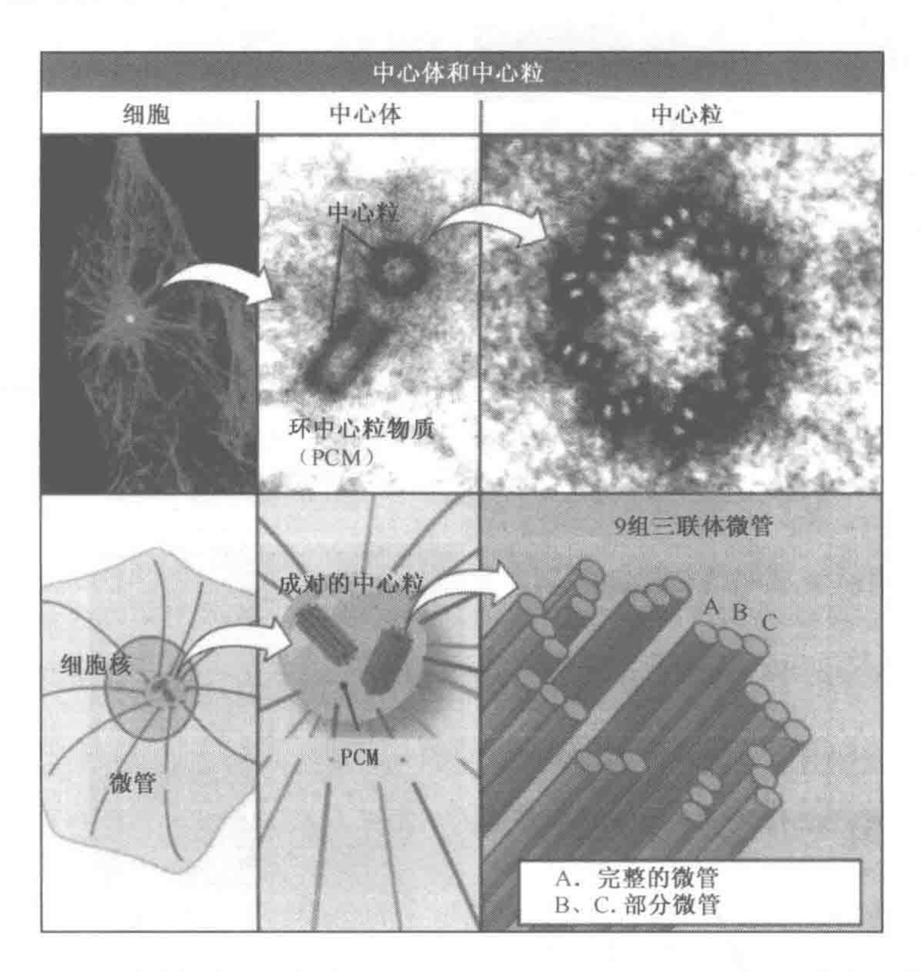


图 7.24　左上图是微管标记成绿色、中心体标记为黄色的整个细胞的荧光显微镜图。微管从中心体以放射状发出。中上方和右上方是整个中心体和两个中心粒中之一的电镜图。中心体的图片显示中心粒怎样相互呈直角排列。图片中的环中心粒物质像是紧紧包围中心粒的颗粒状物质。注意在图的顶部和底部，细胞质是多么清晰。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

环中心粒物质首先是通过电镜发现的，是围绕中心粒的染色比周围细胞质较深的模糊区域（见图 7.24）。现在可清楚地看出它由大量不同类型的蛋白质组成，以某种方式由中心粒把它们聚集在一起。至少有一些环中心粒蛋白组成了三维网格结构。该基质部分由 γ-管蛋白组成，它是管蛋白超家族的另一个成员。γ-管蛋白和其他几种蛋白质组成了一个复合体，称为 **γ-管蛋白环复合体（γTuRC）**。

环中心粒物质的 γTuRC 同 α-和 β-管蛋白相结合，而且是能使微管成核的中心体的成分。该复合体使微管成核的机制目前还不清楚，但是从它的结构上可以得到启发。每个 γTuRC 中的 γ-管蛋白位于很浅的一圈螺旋中，这使它们就像一个防松垫圈，如图

7.25（见图版）。如果在微管表面边靠边地跟踪管蛋白亚基，这种排列就类似于所形成的一圈螺旋，这暗示 γTuRC 作为一个模板对于微管末端的形成发挥作用。然而 γTuRC 的使命是使微管成核，因此可清楚地看出 γTuRC 从负端使微管以成核的方式形成。

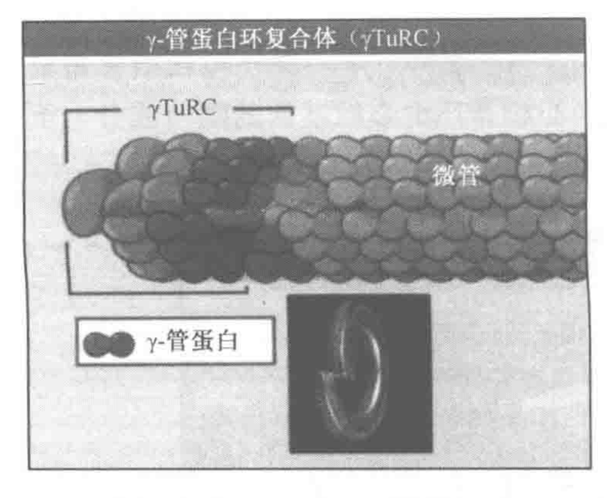


图 7.25 γ-管蛋白（紫色）和一些相关蛋白质（绿色）形成大的复合体，作为微管在负端装配的模板。在复合体中，γ-管蛋白亚单位排列得像是螺旋的一圈，形成一个类似于防松垫圈的结构（下图），直径和微管相同。γ-管蛋白所形成的螺旋的倾斜度和微管中的亚单位相同，这说明该复合体使微管成核是通过对亚单位的第一圈进行定位而完成的。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

在很多细胞中，γTuRC 促成的微管成核决定了微管的方向。由于 γTuRC 只和微管负端相连，由中心体所成核的微管都背向 γTuRC，如图 7.26（见图版）所示。当中心体位于细胞中央时，微管呈现星形的放射状格局，所有的正端都位于细胞的边缘。

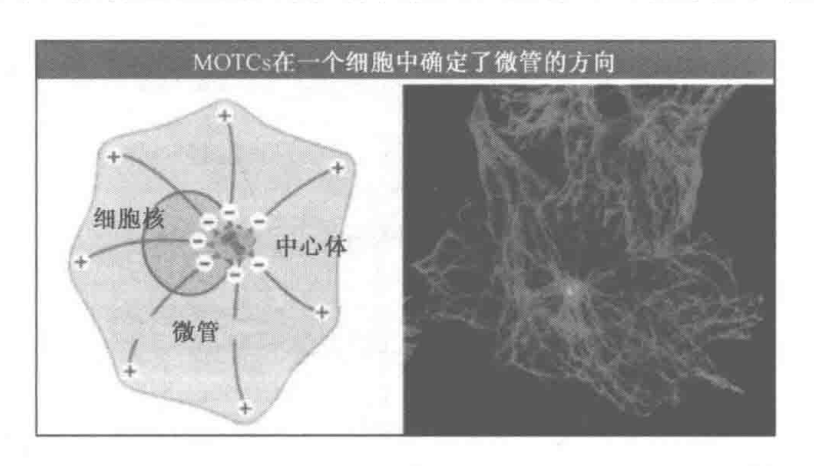


图 7.26 对成核位点进行定位是一种在细胞中组织微管的方式。由中心体所成核的所有微管有相同的极性，而且经常保持和中心体相连。这样就足以把微管组织成放射状排列格局，它们的负端在细胞中央，正端在细胞周边。图中中心体显示为两个橙色的点。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

中心体在每个细胞周期中准备进入有丝分裂时进行自我复制。首先是中心粒复制，同时 DNA 也复制（见第 11 章细胞周期调控）。在复制期间，每个新中心粒与每个原有中心粒呈直角关系。当中心体分裂成两个时，每个新中心体包含一个原有中心粒和一个新中心粒。两个新中心体在细胞有丝分裂时分开（见第 10 章有丝分裂），所以每个子细胞得到一个单一的中心体，其中含有一对中心粒。为什么新中心粒只在已存在的中心粒旁边形成。为什么对于每个原有的中心粒只有一个新的中心粒形成。为什么中心粒相互精确地以直角关系存在。这些问题都还不清楚。中心粒怎样参与环中心粒基质的形成，也是一个未明了的问题。

中心体是一个动态的结构，它在细胞周期中不断改变大小。一旦复制后，中心体就

变大，伴随着细胞准备进入有丝分裂的进程。在有丝分裂开始时，中心体的微管成核速度大约提高5倍。这种微管“出生率”的大幅度提高可能对于有丝分裂非常重要，因为高浓度的微管对于构建有丝分裂纺锤体是必需的。

运动的动物细胞（如精子）含有另外一种更加特异化的微管组织中心，称为基体（basal body）。基体为轴丝（axoneme）的组装提供模板，轴丝是一种由微管束组成的结构复合体，该结构形成纤毛和鞭毛的核心，参与它们的运动过程（见7.16 纤毛和鞭毛是运动的结构）。基体在结构上和中心粒非常相似，含有组装成桶形的9个相互连接的三联体微管。结构上的相似性反映了功能上的某些重叠：在有些细胞中，基体可以转化为中心体。然而和中心粒不同，基体不需要以成对的方式发挥作用，而且直接发挥微管成核作用而不是从环绕的物质起始。在纤毛和鞭毛的形成过程中，新生微管直接从基体的三联体微管处生长。基体依然保持和它们所形成的微管的负端相结合，而且在它们发挥功能时位于纤毛和鞭毛的基部。

并不是所有的细胞都利用中心体使微管成核，但所有的真核细胞都利用某种类型的一个或多个微管组织中心使微管成核和组装。在真菌中、微管的等价结构是一种称为纺锤体极体的结构，它包埋在核膜之下。植物细胞缺少明确的、像微管组织中心一样发挥功能的、界限分明的结构，但有很多分布在细胞皮层的微管成核位点。很多分化的动物细胞类型（包括神经元细胞、上皮细胞和肌肉细胞）都有中心体不接合的微管射线，这暗示细胞内含有另一种类型的较小的微管组织中心，以形成以特殊格局组织的微管结构。例如，上皮细胞在细胞顶端有很多微管成核位点。微管正端从顶端的微管组织中心延伸到细胞底部。植物、动物和真菌的微管组织中心都含有 γ-管蛋白，这说明所有微管组织中心都以相似的机制使微管成核。

7.8 细胞中的微管动力学

关键概念

- 动态不稳定性是细胞中微管周转的主要途径。
- 在细胞内，微管的正端比在体外更加具有动力学活性。
- 游离的负极端从来不发生增长，它要么处于稳定状态要么发生解聚。
- 细胞中含有非动态稳定性微管的亚群体。

细胞中的微管通过动态不稳定性机制进行组装和去组装。既然动态不稳定性描述了一些微管增长，同时其他一些微管缩短的现象，就有必要在活细胞中观察单个微管以研究其转化的机制。为了观察活细胞中微管的装配情况，可以通过表达与荧光蛋白融合的微管来使微管发出荧光信号，或者注射与荧光染料共价连接的纯化的微管蛋白。然后，用光学显微镜观察并每隔几秒采集一次荧光图像。利用这些技术，我们得到了图7.27的结构，图中显示了生活细胞中静态的微管；而在细胞边缘的一些位点，可以看到单个微管不停地重复着生长或缩短的活动——微管的这两种动态状况常常是紧密毗邻着发生的。图7.28显示，在细胞的边缘位置有两根微管，其中一个在生长，而另一个在缩短。

像这样的图片可以用来测定微管长度随时间的变化，并可以比较细胞中和体外微管

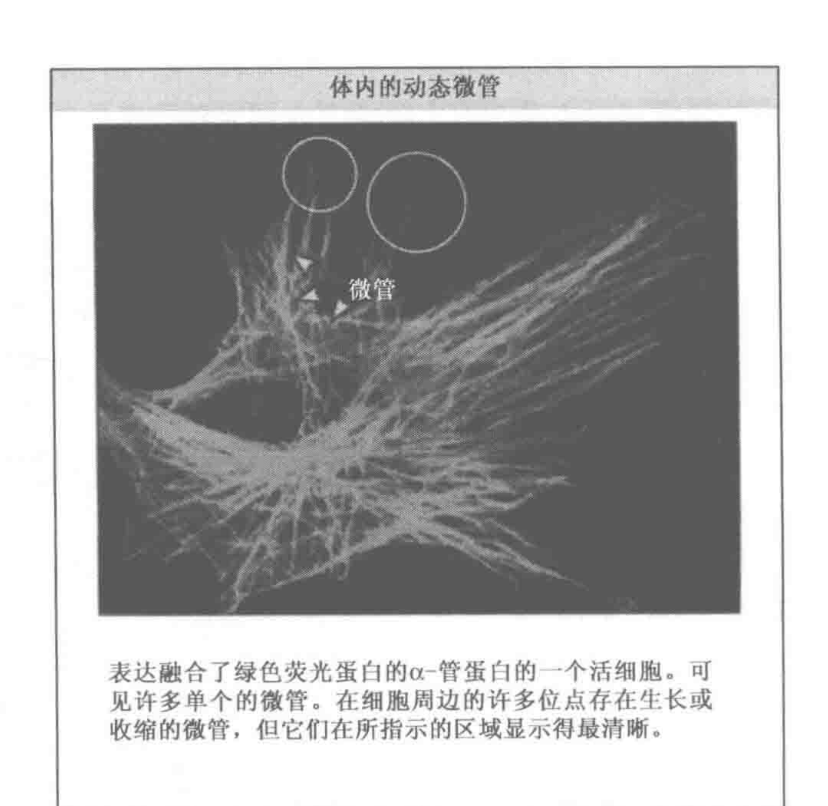


图 7.27 表达荧光管蛋白的细胞的视频截图。微管用浅色显示。在视频显示的过程中，很多微管由于动态不稳定性而发生增长和缩短。在用圆圈标注的细胞中有两个区域具有一些动态的微管。图 7.28 显示了这些区域中一个区域的一系列图片。照片由 Lehigh 大学的 Michelle Piehl 惠赠。



图 7.28 表达荧光管蛋白的活细胞中紧靠边缘的一个小区域。这 4 张图是随时间进程的一系列图片。箭头指示了两根单一的微管。甚至当另一根毗邻的微管开始缩短时，左边的微管还在稳定地生长着。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

的行为。它们显示，纯化微管蛋白在体外装配的微管和细胞内的微管在动态不稳定性方面存在着几方面的不同。在活细胞中，微管的正端要比由纯化的微管蛋白组装的微管更强地表现出动态不稳定性。细胞中微管正端的生长速度比体外的生长速度快 5～10 倍。细胞中的微管会更频繁地在生长和缩短的动态中转化，如图 7.29 所示。微管无明显生长和缩短过程的停顿状态很少在体外发生，但却频繁地在活细胞的微管中发生。微管在体内和体外的动态差异说明，细胞通过对动态不稳定性进行修正或调整来使其加速或者减速。我们在后面的论述中将会看到，这些过程是通过结合在微管上的蛋白质来完成的。

细胞调节微管装配动力学的能力首先是在对细胞间期和有丝分裂期的微管动力学进

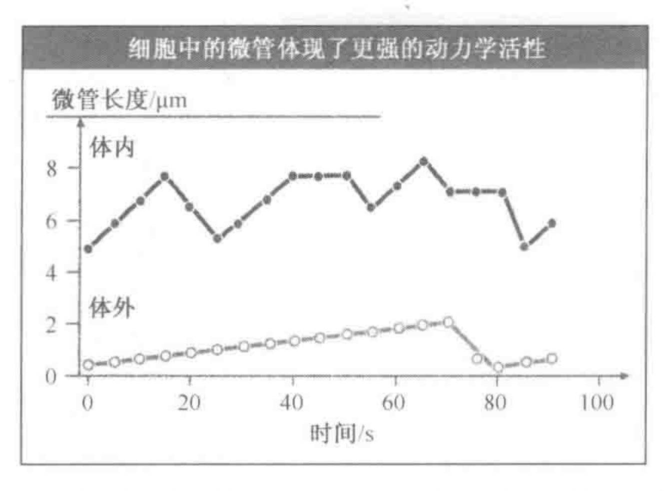


图 7.29　每条曲线都显示的是单个微管的长度随时间的动态变化。体外纯化的管蛋白聚合成的微管（空心圆）稳定地生长超过 1 min 的时间，然后几乎完全解聚，接着又重新开始生长。细胞中典型的微管（实心圆）比体外微管要长好几倍，而且在同样的时间段内发生更多次的动态转换。和体外微管不同，体内微管每次解聚时只失去它全部长度的一小部分，而且有时还在生长和缩短之间发生停顿。

行比较的研究中证实的。起初，研究者利用漂白后荧光恢复技术（FRAP，一种测量新微管在特定区域形成速度的技术。见 7.20 *补充材料：光漂白之后的荧光恢复*）跟踪了活细胞中的微管转化情况。图 7.30 显示了一张通过 FRAP 检测的微管转化的图片。荧光漂白试验证实，间期微管发生了解聚，并被新聚合的微管所取代，其半更新时间约为 5～10 min，而有丝分裂期微管的半更新时间是 0.5～1 min。用上述技术对单个微管的直接观察证实，转化的增加是由于转变频率的改变（如较多的灾变、较少的回补）以及停顿过程的大幅度减少。图 7.31 显示了转变频率改变的一个例子。

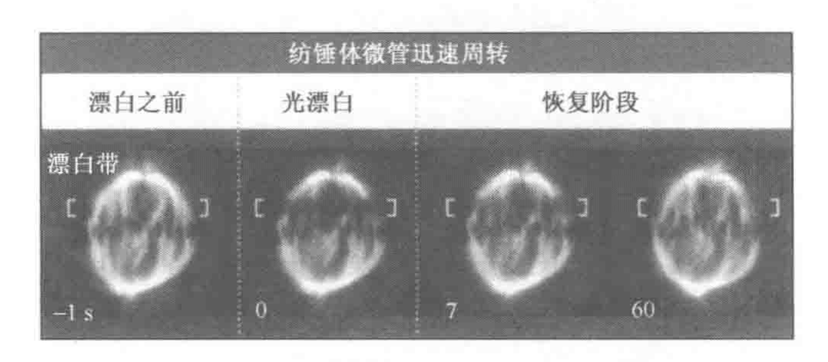


图 7.30　通过漂白后荧光恢复实验（FRAP）证实的纺锤体微管的迅速周转。图中显示了表达荧光蛋白的细胞中有丝分裂纺锤体的微管。纺锤体的两极位于图的上部和下部。在前两张图间，微管蛋白上的荧光标签在特定位置［横跨纺锤体的一条带状区域（由括号显示）］被破坏（漂白）。在 60s 内，漂白区的荧光就又恢复到原先的强度，说明带有荧光亚基的新生围管穿越了这一区域，这是纺锤体中微管的持续组装和去组装的结果。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

在细胞进入有丝分裂期时发生的微管动力学贯穿于整个细胞质中。微管动力学也可以在细胞的特定区域被调控。例如，在细胞中央部位的微管较少发生灾变，并显示出朝着细胞周边持续生长的特点；生长和缩短的转换在细胞周边靠近质膜的部分发生得更为

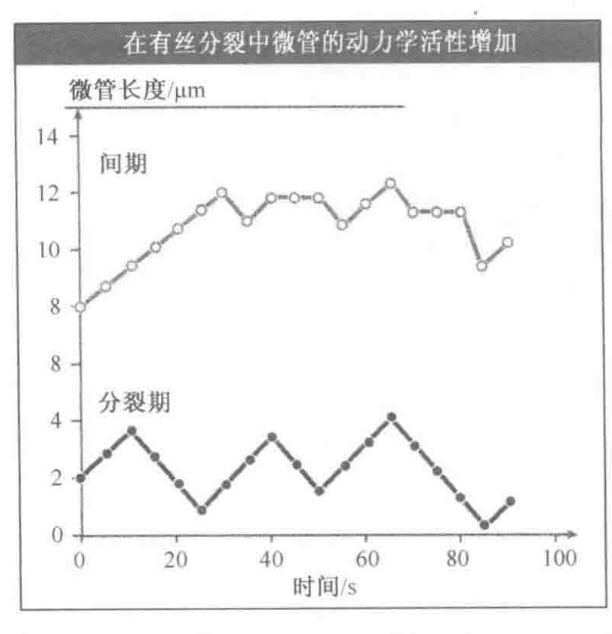


图 7.31 每条曲线都显示的是典型的间期（空心圆）或有丝分裂期（实心圆）微管的长度随时间的动态变化。间期微管更长，而且较少地经历着长度变化；有丝分裂期微管从不保持在某一个长度，在它解聚时，每次都流失大部分长度。因为在动力学不稳定性参数上的细胞周期依赖性变化，有丝分裂期微管比起间期微管来说倾向于缩得更短，表现更强的动力学活性。

频繁。假如其动力学不在细胞内部和细胞周边受到不同的调节，那么就很少有微管能够通过整个路径到达细胞边缘。

并不是细胞中所有的微管都表现出相同的动力学活性。很多间期细胞中有两类不同的微管，它们的转化速度不同。一类是动态的，可以迅速地转化（几分钟内）；另一类中所包含的微管较为稳定，经常持续 1 h 或更长时间。这些稳定的微管在正端不发生生长或缩短，这说明它们的端部可能被一个帽子封住了。图 7.32（见图版）清楚地显示了这两类微管的区别。

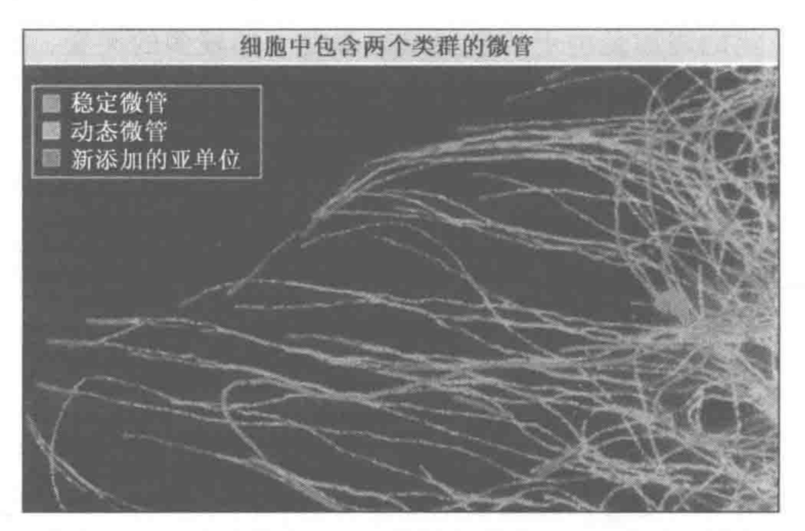


图 7.32 细胞中紧靠边缘的一个小区域中微管的荧光显微图。仅在稳定态微管中发现的共价修饰类型的管蛋白显示为绿色；非修饰型管蛋白显示为蓝色。在即将拍照前，细胞中注射了一种带红色标签的管蛋白，用于对生长的微管末端进行标记。细胞中的微管很少只显示绿色或只显示红色，表明含有两种不同类群的微管。只有绿色的微管冠以红色帽子，说明稳定的微管是不再添加亚单位的。照片由 Columbia 大学内科及外科学院的 Gregg Gunderson 惠赠；复制自 Infante，A. S.，et al. *J. Cell Sci*. 2000. 13：3907-3919。经 Company of Biologists，Ltd. 许可使用。

稳定的微管来源于动态的微管，尽管我们尚不清楚这一过程是怎么发生的。细胞中含有几种可以以不同方式共价修饰 α-管蛋白的酶，它们可能在这方面发挥了作用（见 7.21 补充材料：管蛋白的合成和修饰）。稳定的微管比其他微管含有更多修饰的管蛋

白，这说明它们更可能是酶的优先底物，这些修饰状态的管蛋白可能协助了微管动力学的抑制。稳定的微管有什么功能目前尚不清楚，但已经弄清楚的是不同细胞类型中所含有的稳定微管数目是不同的。在未分化的细胞中，大约有 70％的微管是动态的，30％的微管是静态的。稳定的微管在非有丝分裂的分化细胞中更为丰富，如肌肉细胞、上皮细胞或神经细胞。

微管在中心体处成核，但不是所有微管都囤积在那里。微管可以从中心体处释放出去，尽管其释放速度随细胞类型和细胞周期时相的差别而有所不同。微管从中心体处释放导致正负端齐全的微管游离地存在于细胞质中。不和中心体锚定的微管也可以通过已存在的中心体微管的断裂而产生。只有负端稳定的微管才能自由地保留在细胞质中，尽管目前尚不能确定稳定的机制。在成纤维细胞中，游离的微管迅速解聚，只剩下与中心体相锚定的那些微管；在上皮细胞和神经元细胞中，微管的负端是稳定的，因而游离微管可以存在于细胞质中。这些游离的微管可以被分子马达运输和组织（见 7.11 基于微管的马达蛋白介绍），这使细胞能够以不同于成纤维细胞中所见到的放射状阵列的方式组织微管（见图 7.8）。

在有些细胞中，不和中心体锚定的微管发生着一种被称为**踏车行为（treadmilling）**的周转形式。对于发生踏车行为的微管，正极端的动态不稳定性偏向于产生净增长，而其负端发生缩短。通过这一过程，管蛋白亚单位在微管正端进入，在负端出去，有效地在长度上使微管发生变动，如图 7.33（见图版）所示。踏车行为在植物细胞中表现突

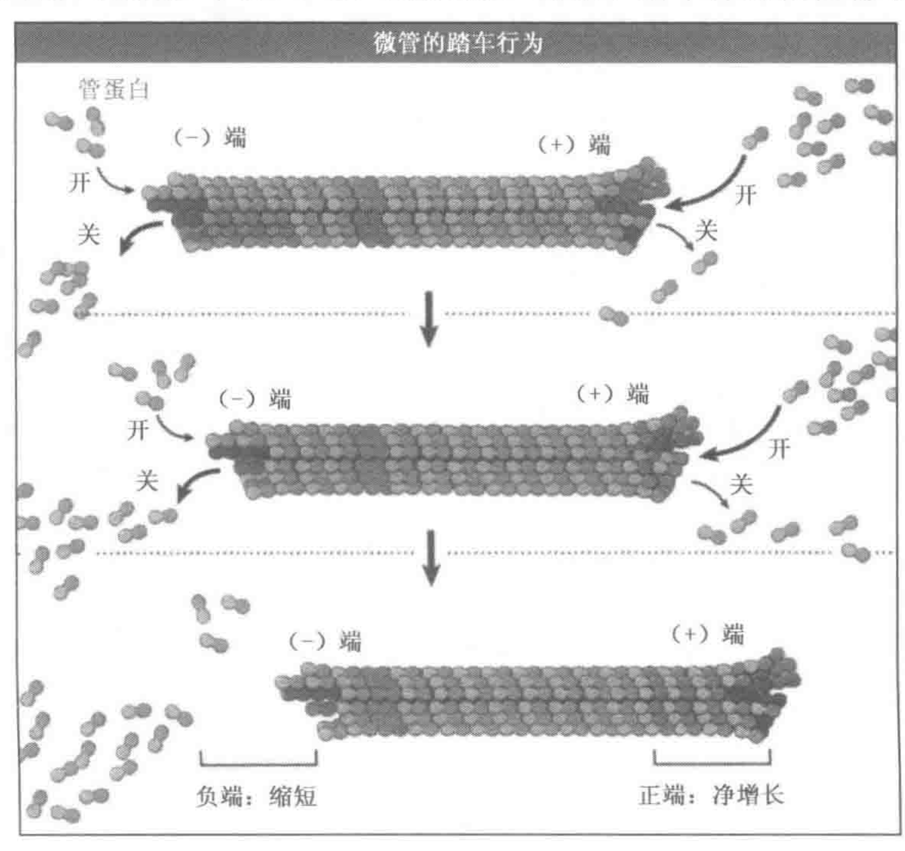


图 7.33　在某些情况下，微管经历踏车行为过程，此时管蛋白亚单位优先在微管的正极端添加上去，在负极端脱落下来。通过在正极端添加、在负极端卸除，微管中的管蛋白亚单位以“踏车”方式从正端输送到负端，见图中标记成红色的管蛋白亚单位。踏车现象是植物细胞中微管周转的主要途径。

出，细胞中没有中心体（见 17.15 原生质表层微管具有高度动态性，能改变自身的方位）。在细胞中观察到的微管踏车现象需要一些辅助蛋白的参与，而这在纯化的管蛋白溶液中没有发现（肌动蛋白微丝的踏车行为的细节见第 8 章肌动蛋白）。

7.9 为什么细胞有动态的微管?

关键概念

- 不论目标的位置在那里，动态的微管都能够搜寻细胞内的空间，并迅速地发现目标。
- 动态的微管具有适应性，而且很容易被重新组装。
- 生长和缩短的微管能产生动力，用来运输小泡或其他胞内成分。
- 微管产生动力的能力使整个微管阵列能够自我组装成星状的形式。

生物的进化明显地有利于动态的微管骨架体系，因为在目前所检测的所有真核生物中都发现了动态的微管。这暗示动态的微管作为真核细胞的特点至少有 7 亿年的历史了。自然选择为什么倾向于产生动态的微管 [尽管动态的多聚体要比一次性产生静态的微管更消耗能量（通过 GTP 水解产生)]? 可能的原因是细胞需要动态的微管，因为它们更容易适应于新的目标。动态的微管能够搜索细胞内的空间，能够重组装，甚至能够产生动力。这些性质使动态的微管骨架更适于实现大范围的细胞功能。图 7.6 显示了当细胞从间期进入有丝分裂期时微管骨架的动态重塑（如果微管不水解 GTP，就不可能发生这些过程。GTP 水解对于造就微管适应性的重要性程度是一个重点强调的内容，这要考虑如果微管不水解核苷，它们的性质将会是什么。见 7.19 补充材料：如果管蛋白不能水解 GTP，将会怎样?)。

关于动态微管搜寻细胞内部物质的能力，可以通过有丝分裂纺锤体的形成加以说明。纺锤体的形成需要源于中心体的微管找到动粒，并以其正端与之结合。动粒是每条染色体上的一个区域，在此处有微管附着在有丝分裂纺锤体上。在细胞尺度内，动粒非常微小，中心体距之遥远。如果将一个细胞放大，每个动粒相当于飞镖投掷场上镖板中央 1 in[①] 大小的靶心，那么中心体就位于投掷线上。如果中心体必须以它的微管为工具对目标进行瞄准，那么就需要有预先存在的关于动粒定位的"知识"，也需要熟悉一些特殊的目标。然而，动态不稳定性使中心体和动粒能够很可靠地连接起来而不需要上述条件。中心体在各个方向使微管成核，实际上是在用大量生长着的微管末端探测整个细胞质空间。那些没有接触到动粒的微管迅速解离，这使它们的管蛋白亚基得以释放并能再次参与微管组装。接触到动粒的少量微管变得稳定起来，建立了两极和染色体的联系。尽管只有小部分成核的微管接触到动粒，但是由于动态不稳定性所造成的微管持续迅速的组装和去组装，所有的动粒在数分钟内就被发现并与中心体联系起来。在这个很短的时间内，每个动粒可以和多达 40 根微管相连。纺锤体形成的"搜索和捕获(search-and-capture)"机制有这样的优点：为了建构起纺锤体，并不需要预先设定形成纺锤体的中心体和动粒的位置关系。这种灵活性机制在每个细胞分裂过程都被利用，

① 1 in=2.54 cm

因为在每个细胞的每次分裂中，有丝分裂期刚开始时染色体的位置都不一样。

图 7.34 显示了有丝分裂纺锤体形成的生长的、缩短的和选择性稳定的微管在其他背景下也很有用，特别是能使细胞对外界环境的改变做出响应。细胞经常需要向着它们的细胞膜所感受到的信号（比如和另外一个细胞接触时）极性生长。目前还不能预测接受信号的位点，它可能只是细胞表面的很小一部分。然而，细胞质中动态微管的持续生长和缩短肯定能使某些微管感受到信号。如果这些信号稳定了微管，它们就可作为小泡运输的更好的高速公路，这使小泡能运输到相应的细胞区域内。通过在某一部位插入新的膜，细胞变为极性生长状态，并改变为更为伸长的形态。一个微管稳定化和细胞极性化的例子发生在当利用剪切力使细胞从培养平板上剥落时细胞修复人工创伤的过程中。修复需要“伤痕”边缘的细胞迁移到伤痕处并开始分裂。在细胞移动前，它们首先在方向上发生极化。极化过程包括细胞微管方向的重新确定，这是由面对伤痕处微管的稳定化造成的。

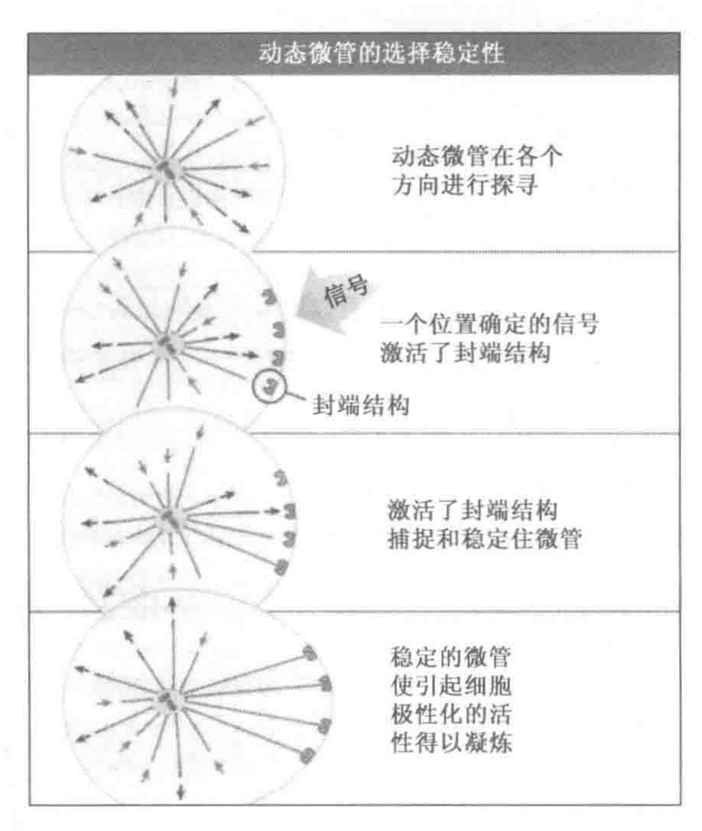


图 7.34 微管稳定性方面的局域性变化对于细胞极性和细胞形态变化产生作用。这里，微管起初是辐射状分布在细胞周边的；通过其动态不稳定性机制，微管在不断的周转过程中有效地在细胞中探寻。终于，一个位置确定的信号稳定住一小簇微管；稳定的微管启动了所在区域的特异性变化（比如使哪里的细胞膜内陷），进而产生使细胞极性化的作用。这种“选择稳定性”（selective stabilization）机制是一种途径，通过它，细胞可以对随机的微管组装-去组装过程进行修正，产生极性化的细胞。

进化过程选择了动态的微管可能还因为它们能产生动力并引起运动。如果一种成分能够与生长或缩短的微管顶端相连，这样的运动是可能的。这种情况下，当微管长度改变时该成分就会受到推动力或拉动力的作用。很多蛋白质和一些类型的细胞器（例如染色体和各种类型的膜泡）都有这种能力，能附着在微管的末端被运输。图 7.35 显示了

一个例子，其中一个小泡在缩短的微管末端被运输。与微管缩短相耦连的运动需要储存在微管中的能量，这份能量源于微管多聚化时 GTP 的水解。细胞中的多数运动由分子马达产生，而不是依赖于微管的生长或缩短，但一个有趣的推测是，动态微管是首先在进化过程中出现的，因为它们使细胞骨架能够对信号产生应答而发生迅速重构，而且能够在细胞质内搜寻目标，并产生动力（分子马达蛋白的细节见 7.11 基于微管的马达蛋白介绍）。

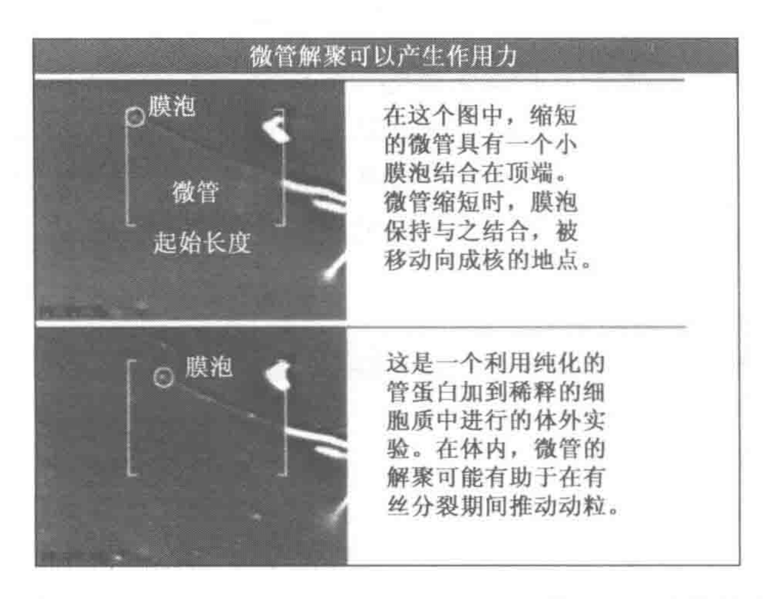


图 7.35 图示两张从一个视频中按序截屏所得的图像。在一个体外实验中，一个膜泡结合在微管的顶端。当微管向着成核位置缩短时，膜泡保持着与微管顶端的结合，向着成核的位点运输。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

动态微管能够产生动力的能力也被用于微管骨架的自身定位，甚至在没有细胞时也是如此。一个利用纯化的中心体和管蛋白进行的实验描述了这种性质，结果在图 7.36

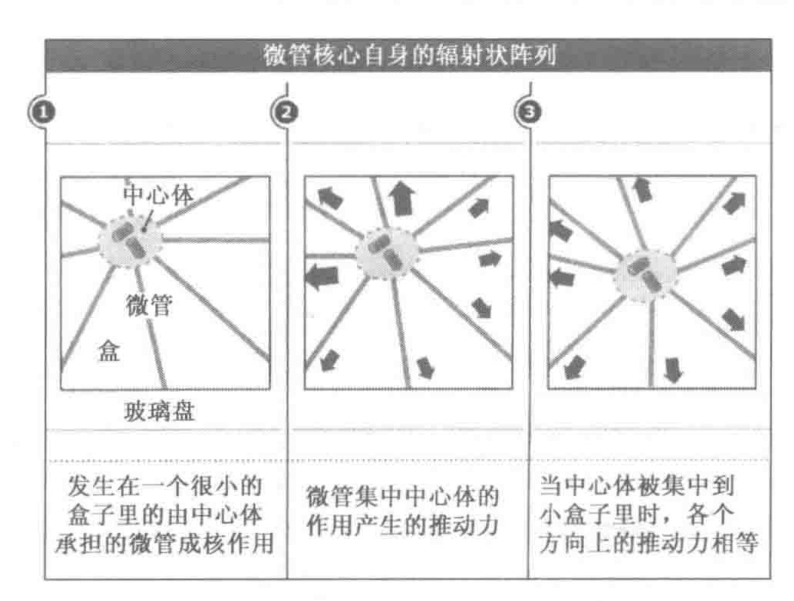


图 7.36 在这个实验中，一个中心体被用来在大约一个细胞大小的小室里形成动态微管的辐射状阵列。在几分钟的过程中，辐射状阵列通过推动力将自己集中起来——这种推动力是由微管对着小室的壁聚合生长而产生的。图中箭头的大小指示了推动力的相对量级。这一实验所演示的一个三维微管阵列的集中和平衡能力可能有时会在细胞内用于将一些结构的位置确定下来。

中显示。如果把中心体放入一个非常小的盒子中［通过影印石版术（photolithography）在玻璃表面形成，该技术也被用于制造电脑芯片］，接着刺激微管成核，中心体就会移到盒子中央，而不论它的起始位置在哪里。这种情况之所以发生，是多聚化的微管朝着与盒子壁相反的方向推动中心体造成的。既然盒子是不动的，中心体和微管就会移动。当中心体定位于盒子的中央时，其所受的推力在各个方向上都是一样的。这一过程和细胞中发生的有些相似，在细胞中很多微管从内部生长到细胞质膜。和人工盒子中的微管非常相似的是，细胞中的微管在与质膜相对的各个方向发生多聚化，使中心体定位在细胞中心的位置。

7.10 细胞利用几种类型的蛋白质调节微管的稳定性

关键概念

- 微管结合蛋白（MAP）通过稳定微管和使微管去稳定来调节微管的装配。
- MAP决定了微管是生长还是缩短的可能性大小。
- MAP能与微管的不同位置相结合。有些MAP结合在微管的边上，有些只结合在微管顶端，还有一些只和管蛋白二聚体相结合并阻止它们发生多聚化。
- 活性的促稳定蛋白和去稳定蛋白间平衡的改变调节了微管的周转。
- MAP的活性受磷酸化的调节。
- MAP也能使膜结构或蛋白复合体与微管相连。

细胞利用微管骨架来完成广泛的功能：有些功能需要使用稳定的微管，而其他一些功能则需要使用动态的微管。细胞经常使其细胞器或其他结构（包括细胞骨架的其他成分在内）与微管壁或微管末端相结合。细胞利用一系列蛋白质——称为**MAP（微管结合蛋白）**——来完成这些功能。有些MAP通过减慢或加速管蛋白结合在微管末端或从微管末端解离的过程，来修饰微管的动态不稳定性；其他一些蛋白质则以结合蛋白的方式使微管的末端或边缘与膜泡或其他结构相结合。有些MAP兼有这两种功能，既可调节微管的装配又可以把一些成分与微管相连。

首先被证实的MAP是在分离哺乳动物脑组织过程中获得的与微管共同纯化出来的蛋白质，图7.37描述了这一过程。有两种MAP（分别称为MAP2和tau）只在神经细胞中存在，参与对于保持轴突和树突所必需的长期存在的微管的制造。它们通过结合微管的侧面来完成这种功能。由于它们一次结合几个管蛋白亚单位，因此影响微管动态不稳定转化的频率。这两种蛋白质都抑制灾变，并在很大程度上能提高回补的可能性，使微管很难变成碎片。结果是，长微管存在的时间因此比它们单独与管蛋白在一起时长得多。这种类型的蛋白质通常沿微管侧面结合，封闭它的表面，可以认为像钉子钉在微管壁上，使其亚单位很难被解离掉。

有几种蛋白质只和微管的正端相结合，这类MAP被称为“＋TIP”。如图7.38（见图版）所示，荧光标记的＋TIP表现为微管正端的短片段。＋TIP只有在微管正端生长的时候才会结合在微管上，就像一直是骑在生长的顶端在上面前进一样。图7.39显示了细胞中表达荧光标记＋TIP的静态图像。有一个视频显示这种蛋白质就像很多小的彗星穿过细胞质移动，每个蛋白质都标记了单个生长微管的顶端。有人认为当新的管

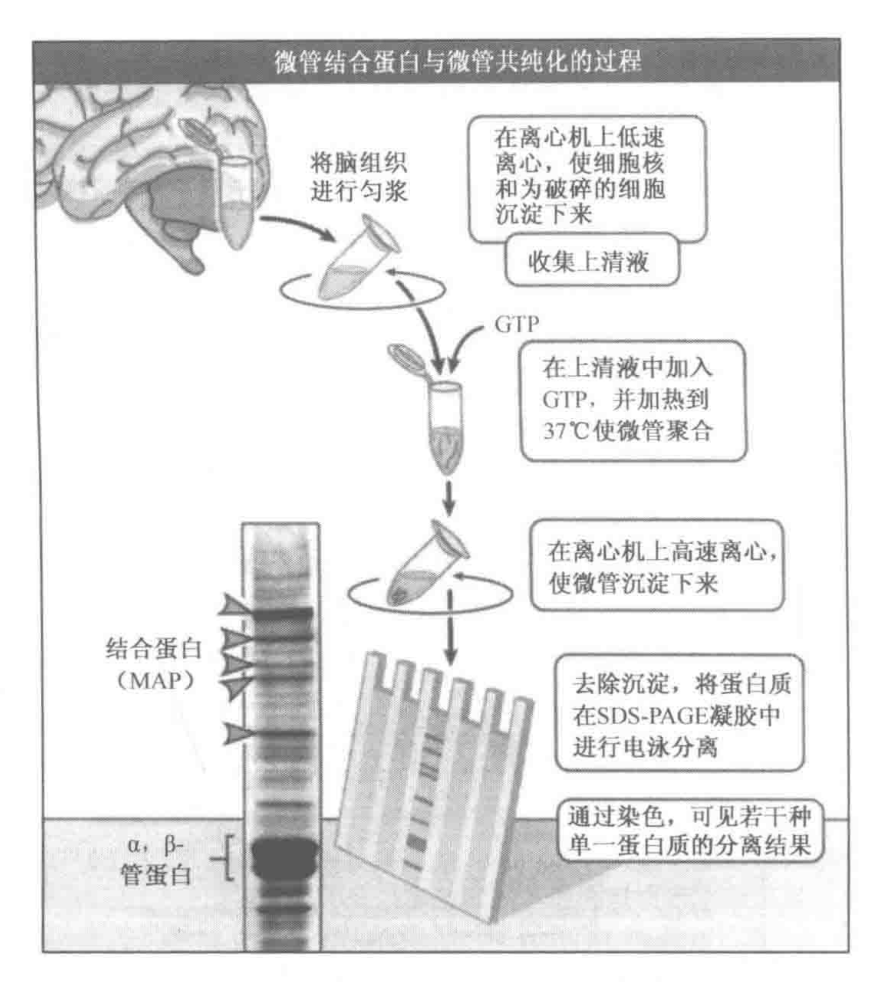


图 7.37 第一批 MAP 的鉴定过程。实验利用的是脑组织，因为其中的神经元中有大量的微管。脑组织在微管将发生解聚的条件下被匀浆，经离心除去所有较大的物质成分，使上清液中只留下可溶性蛋白质，包括浓度很高的管蛋白，它们来自脑组织中所有的微管。当管蛋白聚合，用第二次离心收集微管时，许多蛋白质（包括 α，β-管蛋白）也存在于收集体系中。图片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

蛋白亚单位和微管的生长端结合时，单个＋TIP 与它们结合。每个＋TIP 只和微管结合一小段时间就脱离微管了。当＋TIP 与微管结合时，微管还在继续生长，新的＋TIP 也结合上来。＋TIP 持续和微管末端结合并于其稍微滞后的时间再脱离微管，确保了结合的＋TIP 蛋白在微管末端的浓度是最高的，如图 7.40 显示。有几个不同家族的蛋白质也与微管末端结合。在很多细胞类型中发现的一种＋TIP 是 CLIP-170。这种蛋白质是一类具有两种功能的 MAP，它既可以通过促进回补来稳定微管，又可以将内涵体与微管相连接。

当细胞需要动力学活性强的微管时（如有丝分裂期间），细胞也能够加速微管循环。细胞利用使微管不稳定的 MAP 来加速微管循环。这些去稳定因子使微管更容易发生灾变和缩短，它们还使回补更难以发生，所以微管在开始重新生长前就失去了很多亚基。去稳定因子以 3 种方式发挥作用：它们破坏 GTP 帽以促进灾变；它们切断微管，形成片段，并产生更多的可缩短末端；或者，它们结合游离的管蛋白亚单位以减少可用于聚合的管蛋白量。图 7.41 描述了这 3 种过程。

微管被 kananin 切断，该蛋白质的名字在日语中的意思是剑。Kananin 通过结合微管壁并打断管蛋白亚单位的结合来切断微管。几个分子的 kananin 必须结合在同一根微

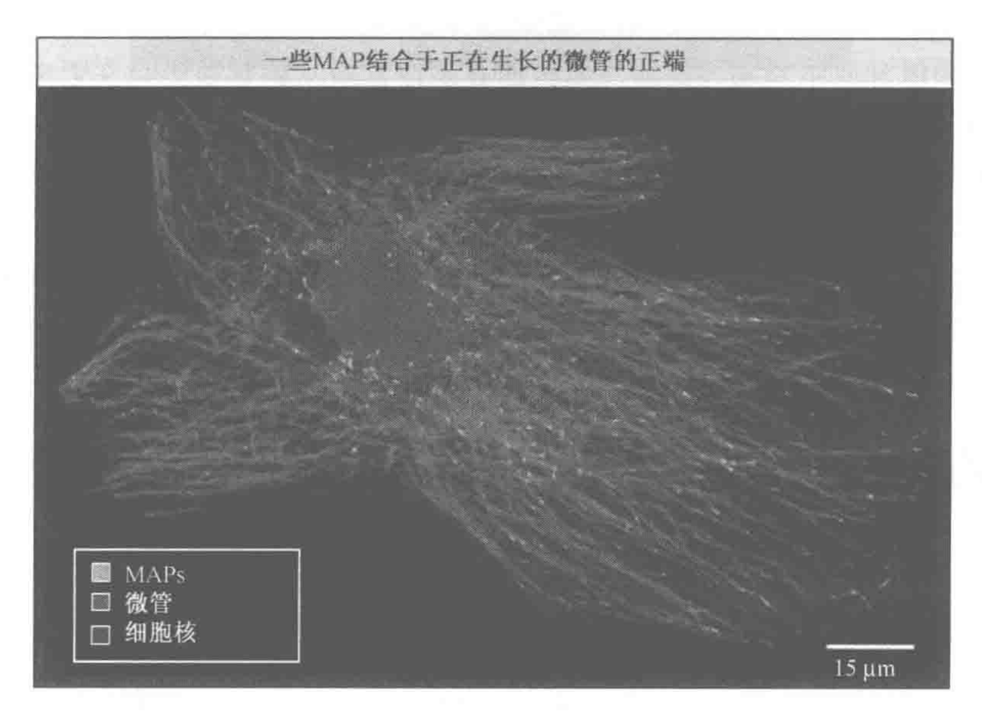


图 7.38　微管及其结合蛋白的荧光显微照片。其中红色荧光显示了微管白，绿色荧光显示了一种只结合在生长中的微管的正极端的 MAP（EB_1）。细胞核以蓝色荧光显示 EB_1 看起来处于微管末端的略微拉伸的短片段上。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

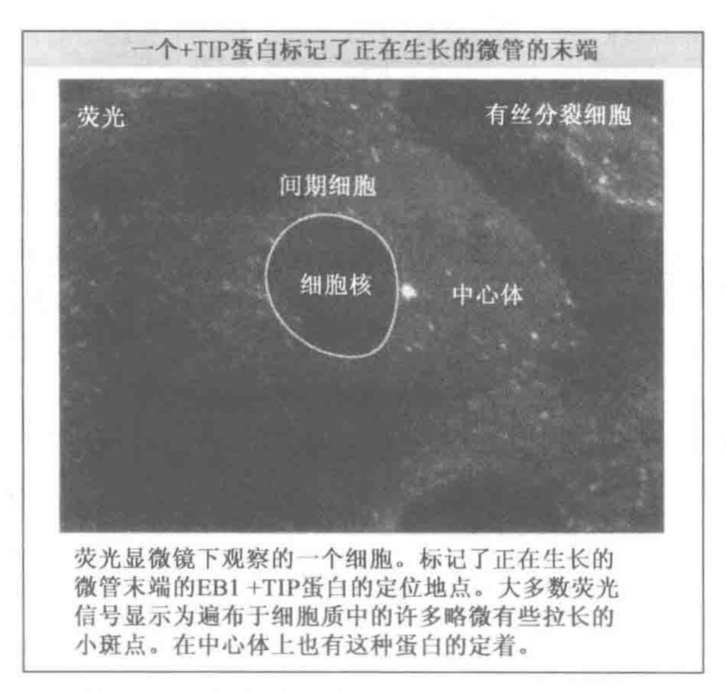


图 7.39　视频中一组系列镜头的一个单张影像。显示荧光标记的＋TIP蛋白 EB1 结合在一个上皮细胞中微管的端部。由于＋TIP 结合在正在生长的微管端部的顶点，它们就好像是在细胞质中“运动”的荧光彗星。这种“运动”实际上代表了微管的生长。上皮细胞中的 EB1-GFP 由 U. S. Tulu 和 P. Wadsworth 提供。

管上并需要水解 ATP 才能打断它。尽管它切断微管的机制已经探明，但还不清楚细胞是怎样利用 kananin 的剪切功能的。Kananin 存在于所有类型的细胞中，对 kananin 突变体和抑制因子的研究说明它参与很多细胞事件。例如，有些生物减数分裂纺锤体的装

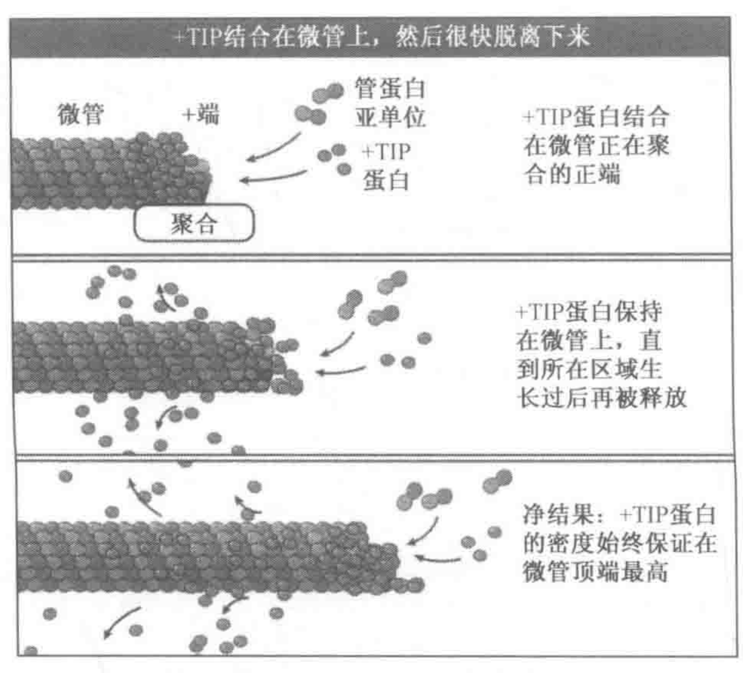


图 7.40　结合和释放的机制使得＋TIP 蛋白定位于生长着的微管末端。

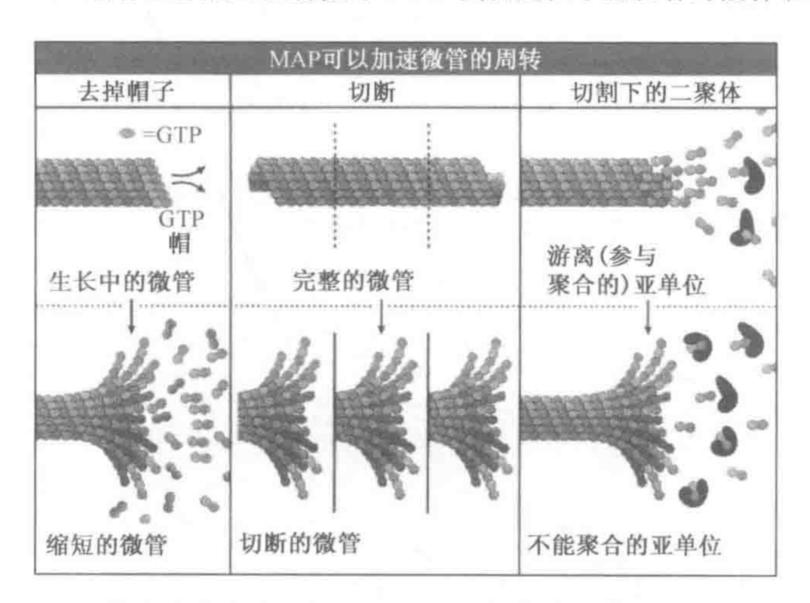


图 7.41　使微管失去稳定性的 3 种方式。去掉微管的 GTP 帽或者在内部打断微管立即引起一端的 GDP 结合的亚单位暴露，使得微管开始解聚。打断微管还会增加末端的数量，而暴露末端的存在会马上导致微管解聚。被隔离下来的游离管蛋白亚单位缓慢聚合，使得发生在每条原纤维末端亚单位中的 GTP 水解更可能发生。

配和植物细胞微管的正常组织都需要 kananin 参与，但每种情况下它是怎样参与的尚不清楚。细胞中 kananin 的一个可能功能是通过把微管打成很多碎片，从而加速长微管的解聚。这在很多大型细胞（如卵细胞）中特别有用。然而 kananin 可能还有其他功能。在有些细胞类型中，人们在中心体中发现了它。有一种假说认为它可能从 MTOC 中释放新聚合的微管。

以破坏 GTP 帽来使微管失去稳定性的蛋白质的一个例子是有丝分裂中心体相关蛋白（MCAK）。MCAK 是分子马达蛋白中的驱动蛋白超家族成员，在控制有丝分裂期微管动力学变化过程中发挥显著作用（见 7.11 基于微管的马达蛋白介绍）。和其他马达蛋

白不同，MCAK 并不搬运货物。相反，它和微管末端结合并使微管末端的结构失去稳定性，这是由于它能使原纤维从微管壁上卷曲出来。卷曲的原纤维和它相邻的原纤维不再结合，破坏了 GTP 帽，微管开始缩短。接着 MCAK 从解聚的微管蛋白亚单位上释放，并可以重新结合在微管上。

在任何时刻细胞中微管的动态由稳定蛋白和去稳定蛋白之间的平衡状态决定。通过使多种 MAP 激活或失活来改变平衡状态，会使微管更加稳定或使循环更迅速。微管的动力学状态受到促稳定和去稳定 MAP 的平衡状态的调控，这一观点首先是因为在青蛙卵中发现了两个 MAP［即 XMAP215（一种微管去稳定蛋白）和 MCAK］而提出的。在青蛙细胞中移去 XMAP215 就会使 MCAK 处于主导地位，结果产生了很高灾变频率的、非常短的微管，如图 7.42 所示。相反，移去 MCAK 会更倾向于导致更长的、更稳定的微管产生，这是因为灾变很少发生。在有丝分裂时，细胞需要保持 XMAP215 和 MACK 之间合适的平衡状态，否则无法形成正常的纺锤体。

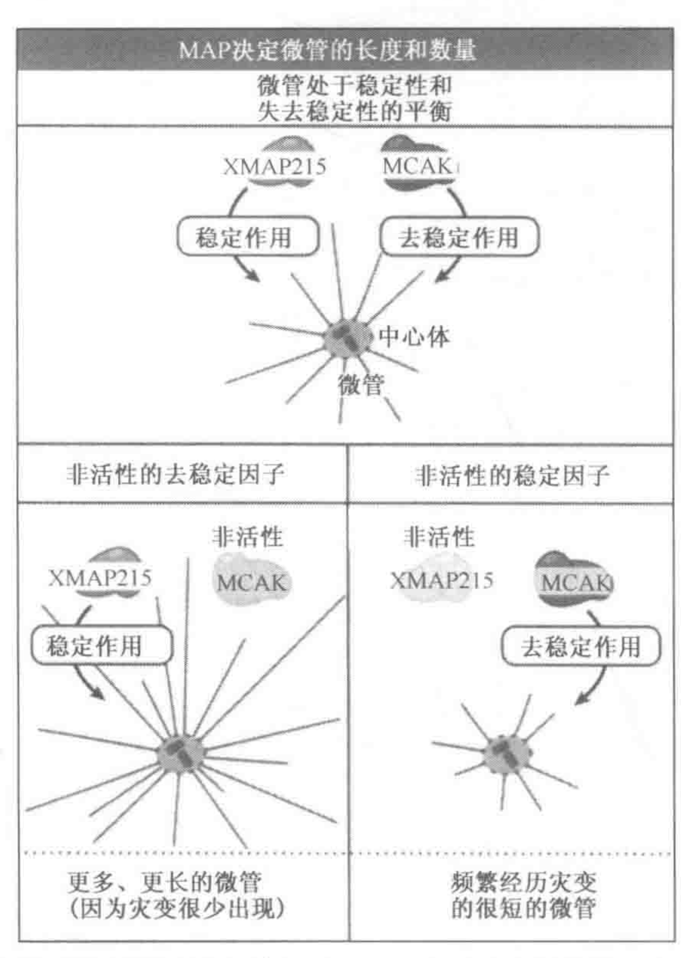


图 7.42　具有微管稳定和去稳定作用的 MAP 成对地发挥作用，决定了一个微管阵列的大小。去稳定因子的失活使得灾变很少有发生的机会，结果导致一个由更多微管组成的更大的微管阵列；稳定因子的失活具有相反的结果。通过对立成分的平衡决定微管阵列的大小，使其大小很快地发生改变。

MAP 的活性是怎样调节的呢？通常来说，微管稳定性的改变发生得太迅速了，它不可能参与编码 MAP 的基因表达的改变。相反，很多 MAP 活性是被磷酸化所改变的。例如，tau 蛋白的磷酸化减小了它对微管的亲和性，因此减弱了它稳定微管的能力。MAP 的磷酸化不一定在整个细胞范围内发生。相反，细胞某一范围内激酶的活化可以

只在该特定区域内改变MAP的活性。通过转换微管促稳定因子和去稳定因子的“开启”和“关闭”状态，细胞能够通过调控使微管的稳定性发生倾斜，使之或者更稳定或者更表现为动态活性。通过在局部区域改变MAP的活性，细胞能够通过使微管长得更长或在局部区域消失来对信号做出应答。局部MAP的活性调节可以发生在细胞运动的时候，也可以发生在有丝分裂纺锤体装配的时候。

Tau蛋白的磷酸化也与阿尔茨海默症相关，尽管还不明白微管动力学的改变在该病中发挥什么样的作用。当tau蛋白过磷酸化时，在有此病的人脑中，它聚集成为神经纤维束（neurofibrillary tangle)，如图7.43所示。目前还不清楚tau蛋白缺陷是神经退行性疾病的原因还是结果。尽管还不知道tau蛋白缺陷是否是阿尔茨海默症的病因，但已知几种其他人类神经疾病是由于tau基因的突变所致，这种突变导致tau蛋白形成纤维束，最终导致神经退行性疾病。

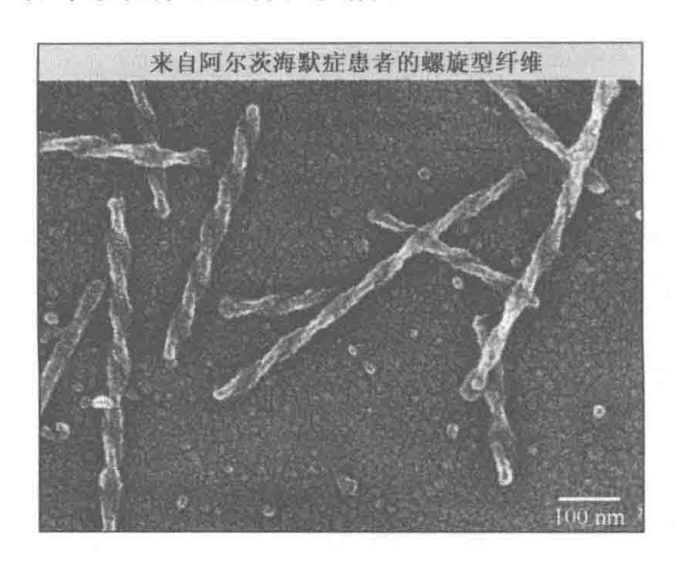


图7.43　Tau蛋白（神经组织中的一种MAP）在阿尔茨海默症相关的神经退行性病变过程中发生过磷酸化，并聚集成严重的螺旋型纤维。这里是纯化的纤维通过电子显微镜进行观察的结果。照片由Philadelphia整骨医学院的Denah Appelt和Brain Balin，1994惠赠。

7.11　基于微管的马达蛋白介绍

关键概念

- 几乎所有行使功能时需要微管的细胞都需要基于微管的马达蛋白（motor)。
- 分子马达是一类酶，它能产生动力，并沿着微管向正端或负端“行走”。
- 马达的“头部”结构域和微管结合并产生动力。
- “尾部”结构域通常和膜或其他货物结合。
- 动力蛋白（dynein）向微管的负端“行走”。

微管的一个主要功能是作为轨道将细胞中的物质从一处运输到另一处。在这些胞内“高速公路上”运输货物的“卡车”被称作分子马达（molecular motor）蛋白。分子马达是微管结合蛋白，它利用重复的ATP水解循环提供的能量在微管上持续移动。这些分子马达将内化的小泡运输到内涵体内，并在整个细胞范围内运输线粒体或内质网（ER)。一个相当壮观和明显可见的微管马达工作的例子是在一些鱼类鳞片细胞或两栖动物皮肤细胞中协调色素颗粒（包裹色素分子的小泡）的运输。为了应答来自神经系统的激素和信号，微管依赖性分子马达或者在细胞中聚集这些小泡，或者在整个细胞质范围内分散这些小泡，这使得动物能改变颜色以躲避捕食者。图7.44～图7.46显示了这些例子。

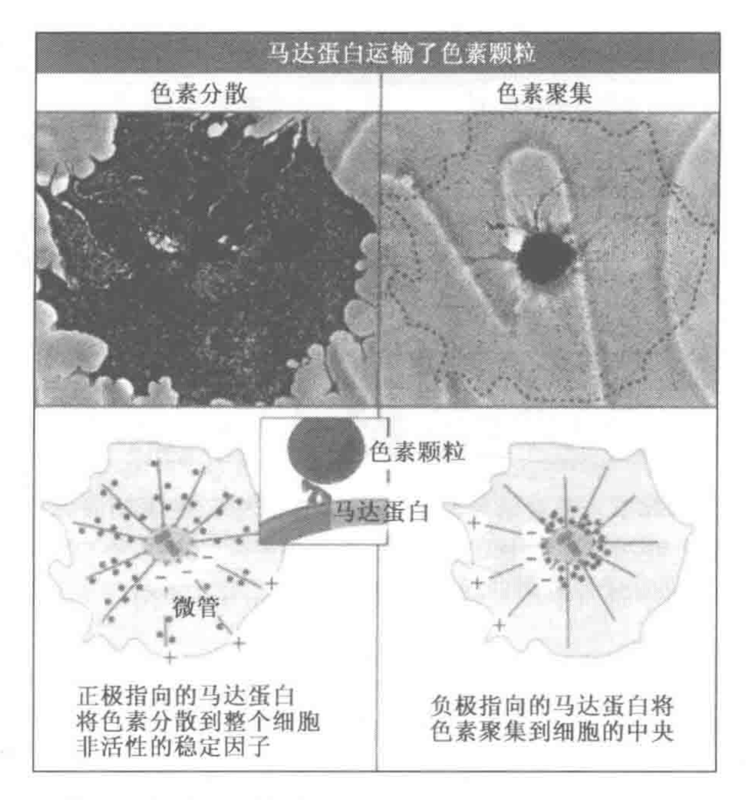


图 7.44　照片显示了一个单一细胞包含了数以千计的色素颗粒——致密地包裹了深色色素的颗粒状结构。在图的右侧清亮的区域可见一些单一的颗粒是非常小的点状物，在每一个颗粒上都有正极指向或负极指向的马达蛋白结合在上边。在应答褪黑激素（melatonin）时，负极指向性马达蛋白沿着微管将颗粒向内运输，使其聚集到细胞的中央；在没有激素时，其他马达分子沿着微管将颗粒向外运回，使得颗粒重新分散到整个细胞当中。照片由 Connecticut 健康中心大学的 Vladimir Rodionov 惠赠。

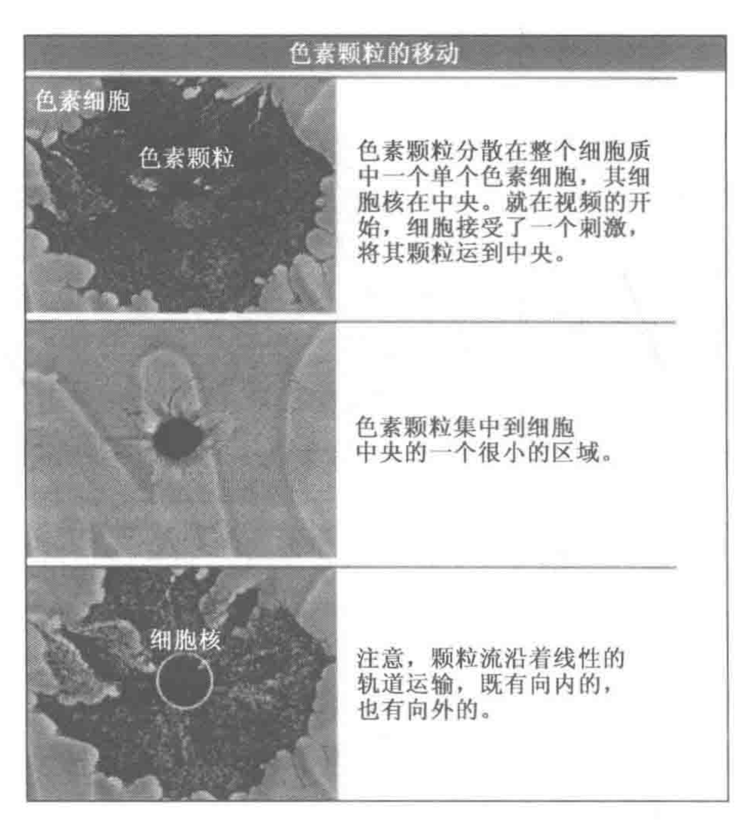


图 7.45　从视频系列镜头中截取的稳定图像，显示色素细胞中色素颗粒的运动。在上方的图片中色素颗粒分散到整个细胞中；在中间的图片中颗粒已经汇聚到细胞中央；在底部的图中，颗粒又重新回到它们在整个细胞中的分布。在视频中，色素颗粒的运动发生在线性的轨道上。照片和视频由 Connecticut 健康中心大学的 Vladimir Rodionov 惠赠。

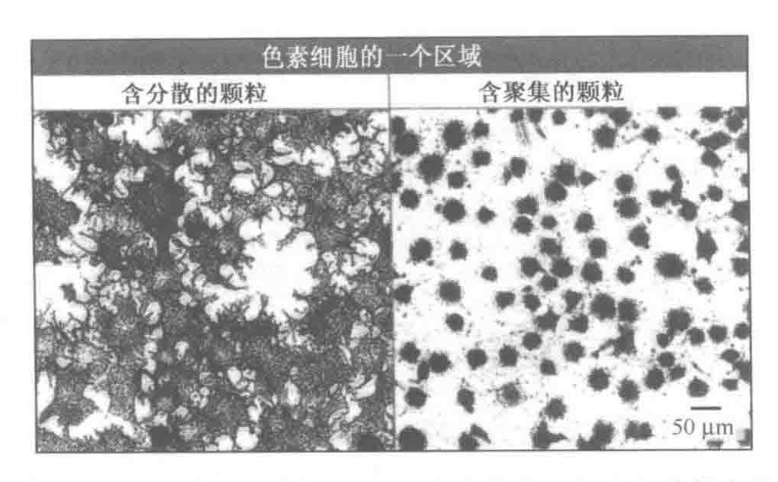


图 7.46　正常情况下，色素细胞分散于整个皮肤中。色素朝着每个细胞中央的运动使得动物改变颜色。这里，培养体系中色素细胞的一个区域接近于转换。照片由 Connecticut 健康中心大学的 Vladimir Rodionov 惠赠。

除了运输很多细胞内的膜结构以外，马达蛋白还在有丝分裂期间移动染色体或在细胞内指导纺锤体定位。马达蛋白还为纤毛和鞭毛的拍打运动提供动力，这使特殊的细胞（如精子）能够运动或静态的细胞能够在它们的表面移动物质。有些病毒劫持和利用细胞的马达蛋白把自己运输到细胞核。HIV 就是一个利用细胞运输系统的病毒的例子。

然而，运输不是马达蛋白唯一的功能。与我们在高速公路上运输货物的卡车不同，分子马达蛋白能够改变它们跑于其上的微管"高速公路"系统的形态格局并对其进行组织。简单描述马达蛋白作用的某些方面可以很明显地看出，这些分子机器是所有真核细胞中广泛存在的成分，几乎在所有依赖于微管的事件中发挥着一种主要作用。

细胞有两个移动于微管上的分子马达蛋白家族——驱动蛋白（它经常移向微管的正端）和动力蛋白（它经常移向微管的负端）。微管通路的组织和某一马达蛋白移动的方向为细胞内货物运输到目的地提供了导向信息。对于成纤维细胞中呈放射状的微管体系（见图 7.8），移向微管负端的马达蛋白会向细胞中心运输货物（例如运输到细胞核或高尔基体），而朝向正端的马达蛋白会向细胞边缘运输货物（例如运输到细胞膜上）。在一个极性多聚体上进行某一方向的移动是分子马达的本质特征，不管它是在微管上还是在微丝上移动的马达蛋白。在这种意义上，多聚体的极性形成了移动的方向和马达蛋白的有导航运。中间纤维缺少极性（见第 9 章中间纤维），目前也没有发现利用中间纤维作轨道的马达蛋白。

被驱动蛋白或动力蛋白托运的货物还有微管本身，而且马达蛋白经常在细胞中组装和重组装微管中发挥作用。如图 7.47 所示，如果微管被锚定了（如果它结合在中心体上），马达蛋白就移动在微管上并在其上运输货物；如果情况是相反的，即马达蛋白被锚定了（例如锚定在细胞皮层上），微管就会被马达蛋白所移动，后者帮助其重新组装起微管阵列（见图 7.49）。如果是微管本身在移动，它的极性对于提供导航线索依然很重要。在这种情况下，微管的极性决定了它自己移动的方向。

所有的分子马达蛋白，包括基于微丝的马达蛋白 myosin（肌动蛋白）（见第 8 章肌动蛋白），有一个使它们能发挥功能的形态特点。当用电子显微镜检测单个马达蛋白分子时就可以清楚地看出形态，如图 7.48 所示。在每种情况下，马达蛋白有一对相同的

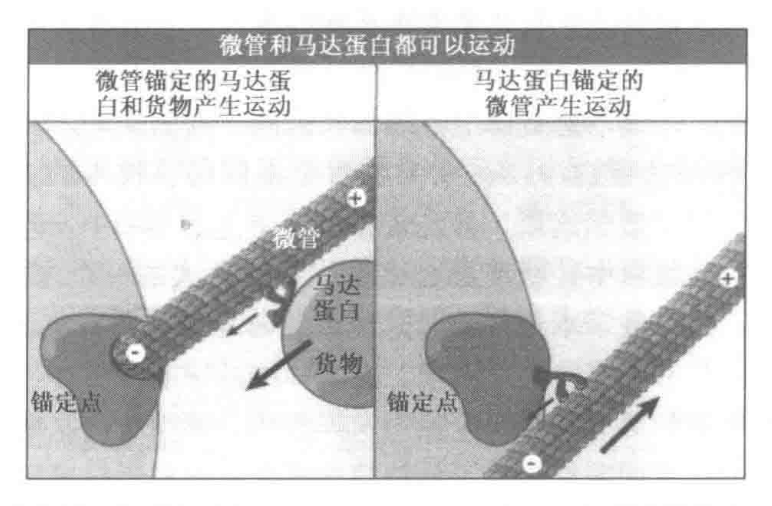


图 7.47　是微管运动还是马达蛋白运动取决于相互作用它们哪个被锚定。两种情况在细胞中都是普遍的现象。若微管被锚定，则可以实现膜泡运输；若马达蛋白被锚定，则使得细胞骨架得以进行重新编排。

大型球状结构域，它们和一个长棒状结构域相结合，产生一个总体上为细长（40～100 nm）的形状。很多马达蛋白在另一端有一对较小的球形结构域。大型球形结构域含有马达蛋白的多聚体（微管或微丝）结合位点和 ATP 结合位点，被称为“头部结构域”或“马达结构域”。它们是马达蛋白用来产生动力仅需要的部分；另一些结构域将它们产生的动力在细胞内用于特殊目的。动力蛋白是一种独特的蛋白质，有一个自球形头部延伸出来的“柄”。至于动力蛋白，它正是柄的末端，结合于微管上，而与两个头部相对的马达蛋白另一端被称为“尾部结构域”——这正是货物（如小泡）结合的地方。

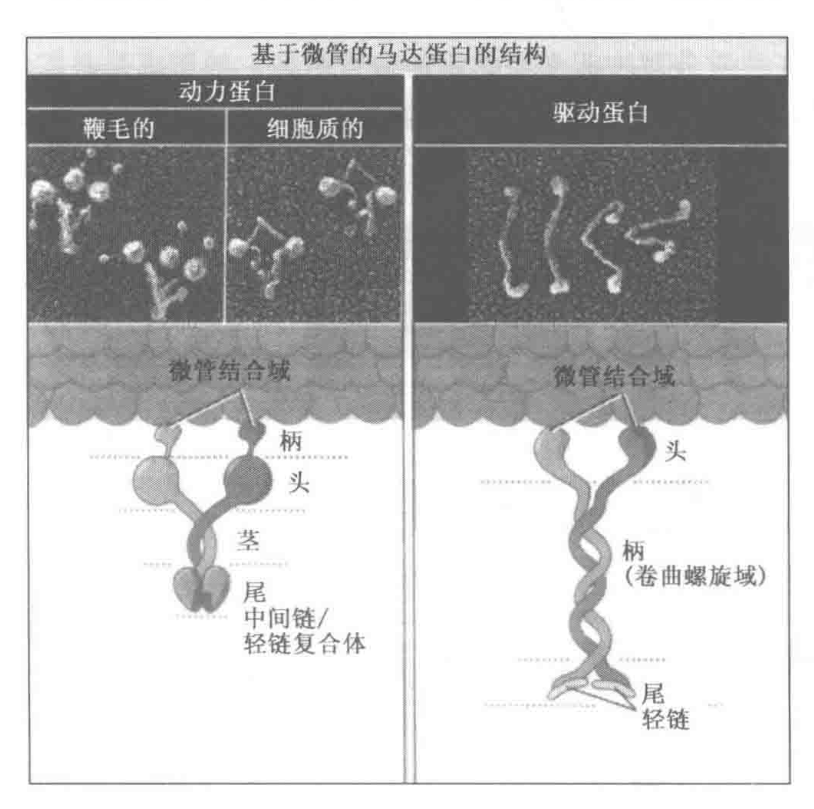


图 7.48　顶部的图片显示了基于微管的马达蛋白的结构，是来自旋转投影（rotary shadowing）和电子显微镜的照片。下图显示了结合在微管上的马达蛋白。每一个马达蛋白包含了两个或多个大型多肽（重链），还有几个小型多肽（中间链和轻链）。照片由 Washington 大学医学院的 John Heuser 惠赠。

通常，单个马达蛋白分子含有几个大小不同的多肽。它的大部分由一个最大的多肽组成二聚体，称为“重链”(heavy chain)。两个重链由跨越其大部分长度的卷曲螺旋间的相互作用联系起来，形成马达蛋白中心的棒状区域。卷曲螺旋末端的区域形成头尾结构域。在每种类型的马达蛋白中，有一个或两个不同的、较小的多肽，称为“轻链”(light chain) 和每一个重链相连接，并经常在马达蛋白的功能中发挥调节作用。

在基于微管的马达蛋白中，驱动蛋白超家族是非常大的一个家族。人类大约有 45 种不同的驱动蛋白，这个数字本身显示出微管依赖的马达蛋白在细胞中功能的多样性，以及它们中某些成员具有的高特异性程度。有多一半的驱动蛋白参与将细胞中货物向特定位置的运输，而剩余的部分在有丝分裂中发挥作用。驱动蛋白家族的明显特征是马达结构域中一段序列的高度同源性。除了马达结构域外，驱动蛋白家族在序列上有较大的差异性，经常完全不相同。这些可变区很可能使每个驱动蛋白与各自特定的货物结合。

基于重链中马达结构域的位置，可以将驱动蛋白超家族大致分为三类。第一类驱动蛋白的马达结构域在重链 N 端附近。这种通用驱动蛋白能使小泡移向微管的正端。驱动蛋白超家族另一类成员的马达结构域在重链 C 端附近。马达结构域在 C 端使驱动蛋白朝微管的负端移动。还有一小类驱动蛋白（例如 MCAK）的马达结构域在重链的中心位置附近。有内部马达结构域的驱动蛋白并不为运动提供动力，它通过 ATP 水解来减弱微管末端的结构以对其进行动力学调控（见 7.10 细胞利用几种类型的蛋白质调节微管的稳定性）。

有些驱动蛋白的尾部可以相互联系形成四头-双极性马达蛋白。如图 7.49 所示，在相对方向也含有马达结构域会使马达蛋白同时结合在两根微管上，使其相互滑动。微管的相互滑动在有丝分裂期非常重要（见第 10 章有丝分裂）。这种现象对于有丝分裂纺锤体和中体（一种在胞质分裂中起必要作用的微管结构）的形成是必需的。可以清楚地看出，这种类型马达蛋白的唯一货物是微管本身，它们的作用仅局限于对微管骨架进行重组。

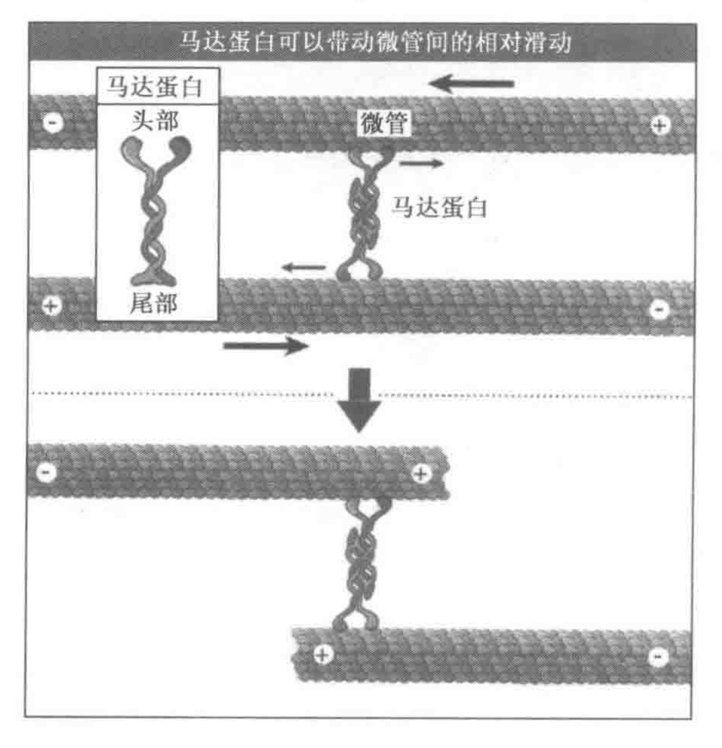


图 7.49 一些驱动蛋白通过它们的尾部结构域结合起来，形成在两端有两个马达结构域的双极马达蛋白。这样的马达蛋白能够同时结合两根极性相反的微管并沿着它们的走向运动，这样产生的净结果是两根微管相互滑动。图中短箭头指出了马达蛋白的运动方向，长箭头指出了微管的运动方向。

和驱动蛋白大家族相比，动力蛋白家族相对较小。和驱动蛋白不同，动力蛋白只移向微管的负端，所有细胞只有一种细胞质类型的动力蛋白，它在货物运输和有丝分裂中发挥作用。胞质动力蛋白（cytoplasmic dynein）是由两个相同的重链组成的二聚体，产生一个有两个马达结构域的动力蛋白分子。动力蛋白家族的另一些成员是轴突动力蛋白（axonemal dynein），它们只在纤毛和鞭毛中被发现。和细胞质动力蛋白不同，轴突动力蛋白是异二聚体，或是含不同重链亚单位的异二聚体，而且每个分子中含有 2 个或 3 个马达结构域。这一方面内容以及轴突动力蛋白怎样为鞭毛和纤毛提供动力的问题将在 7.16 *纤毛和鞭毛是运动的结构*中讨论。

7.12 马达蛋白是怎样发挥功能的

关键概念

- 马达蛋白通过水解 ATP 为运动提供能量。
- 结合于马达蛋白头部结构域的核苷（ATP、ADP 或没有核苷）会决定头部与微管结合的紧密程度。
- ATP 水解也改变了头部的形态。形态改变被放大以使马达蛋白分子有较大的移动。
- ATP 水解和核苷释放的循环耦联了与微管的结合，同时马达蛋白头部结构域的形状发生改变。通过这一机制马达蛋白沿着微管行走，ATP 每水解一次它就移动一步。

分子马达蛋白利用 ATP 作为燃料来为运动提供动力，但是马达蛋白怎样将储存于 ATP 中的化学能转化为机械运动呢？在本节，如果我们没有合适的方法观察马达蛋白运动的话，我们就不能对此知晓太多。我们在这里不探讨微管依赖的马达蛋白是怎样研究的，但如果你愿意，可以参考 7.22 *补充材料：基于微管的马达蛋白的运动性分析*。

对马达蛋白的最基本要求是，它必须在同 ATP 结合和同 ADP 结合两种场合之间有较大的构象改变。这种改变由马达结构域和该分子中与它相邻部分的变化来完成，这类似于我们移动手臂和腿。对于马达蛋白和我们的四肢来说，一处形态的较小改变都会导致另一处形态或位置的较大改变。就像某人走路一样，例如大腿肌肉的一个小的收缩就会把腿拉起来向前，把肌肉长度的较小改变放大成脚的位置的很大改变。对于马达蛋白，其头部结构域在结合 ATP 的区域发生形态上的较小改变，这种改变由 ATP 水解为 ADP 所致。核苷结合口袋的变化被放大到分子的其他部位，使一个头部结构域向前移动。

分子马达蛋白和步行者都有一个共同的需要，都需要能够离开它们与轨道结合的表面，否则它们都不能向前移动。就像一个步行者一样，需要把脚抬起来才能使腿朝前移动，马达蛋白也必须能够从微管上释放才能移动。为了离开微管，马达蛋白必须减小其对微管的亲和力。马达蛋白与微管的亲和力取决于是 ATP、ADP 还是没有核苷结合在马达蛋白的核苷结合口袋中。对于驱动蛋白来说，当结合 ATP 时，其对微管的亲和力是最强的。通过改变驱动蛋白结合微管的强度，ATP 水解和核苷释放能调节这种马达蛋白与微管的结合。由于 ATP 水解也会引起马达蛋白头部结构域的形态变化，核苷结合、水解和释放的循环能协调起来调控马达蛋白的形态及其与微管的结合。每个 ATP

水解能使马达蛋白能沿着微管前进“一步”——这里一步是指一个结合于微管、构象变化和释放的循环。

对于有两个头部的马达蛋白，人们可能设想两种可能用于以合适的步骤沿着微管产生运动的不同方式。这两个马达可以进行头过头的运动，如图7.50（见图版）所示，后面的头每前进一步就会超过前面的头。这种前进方式类似于我们走路，每前进一步，一只脚就会超过另一只脚。另一种可能方式是马达结构域以“尺蠖（inchworm）方式”移动，后面的头移向前面的头，然后前面的头再朝前移动，进行周期的重复（见图7.50）。目前所有研究的两头马达蛋白当通过微管时都用头过头方式移动。换句话说，可以认为驱动蛋白和其他马达蛋白在沿着微管“步行”。

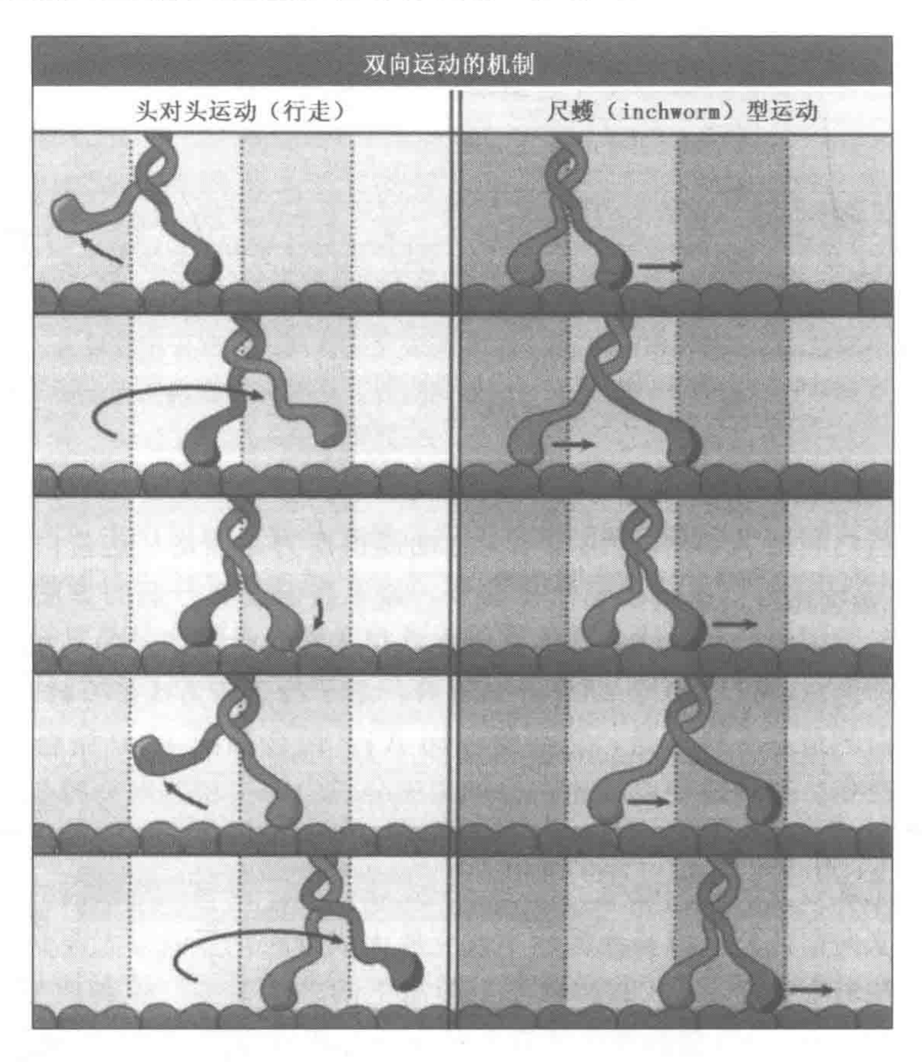


图7.50　一个双头马达蛋白能够沿着微管运动的两种可能方式。两头活性的协调作用能够引起一种“尺蠖型”移动过程（右）。其中红色的头向前行走，橙色的头跟着行进，这样形成循环运动的模式，橙色的头不可能超过红色的头而跑在前边。尽管这一机制是可能的，但是利用它的马达分子还在探寻之中，等待发现。相反，所有已知的驱动两头马达蛋白运动的机制都是一种与人类徒步行走相类似的机制，其中两个头相互交错地迈步前行，以交换步伐的方式前进（左）。

对于驱动蛋白的移动能力，本质的东西是一个小结构域，叫颈部连接（neck linker），是一个含15个氨基酸的伸长区域，它通过卷曲螺旋结构域连接了驱动蛋白的头部结构域。颈部连接是驱动蛋白的一部分，它可以把核苷结合口袋小的结构改变放大为

大的改变，这种大的改变对于驱动蛋白能够移动显著的距离是必需的。大的改变利用颈部连接的前后摆动，使人看起来它们像是驱动蛋白的“腿”。正如我们现在将会看到的，当颈部连接前后摆动时，两个头部的 ATP 循环起到驾驭作用，使行走能够完成。

当驱动蛋白沿微管行走时，两个头部串联地进行工作。一个头部发生的事件常常是另一个头部变化的结果。为了理解使马达蛋白能沿着微管行走的循环，我们研究了驱动蛋白刚“着陆”到微管上的情形，如图 7.51 所示。其中一个头部和微管紧密结合，但在它的活性位点没有核苷结合；它的颈部连接在它后面。第二个头部在它的活性位点有一个 ADP，位于第一个头部之后，像是沿着微管摇摆在清风中一样。驱动蛋白此时准备迈开第一步，然后两个头之间发生协调作用。ATP 结合在前面的头（头 1）上，促使它的颈部连接摇摆到微管的正端，与头部 1 所关联的移动结果是使头部 2 从尾随地位移动到领先地位。此时，它结合在微管的另一个结合位点处。它的结合较为微弱，并释放出 ADP。在头 1 的 ATP 水解加强了头 2 和微管的相互作用，导致两个头都和微管紧密结合的中间状态。一旦头 2（现在是在前面的头部）紧密结合了，头 1（现在是滞后的）就释放出它水解 ATP 时产生的磷酸基团。磷酸基团的释放导致头 1 离开微管，并使得头 2 发生重新打开它的活性位点的构象变化。整个事件的循环导致驱动蛋白重新回到它的起始状态，主要区别在于头 2 在前，并且驱动蛋白分子又向微管正端前进了 8 nm。当头 2 结合 ATP 时，就会开始第二个周期。两个头这样数百或数千次地转换角色，每轮转换就会前进一步，使马达蛋白移向微管的正端。图 7.52（见图版）显示了

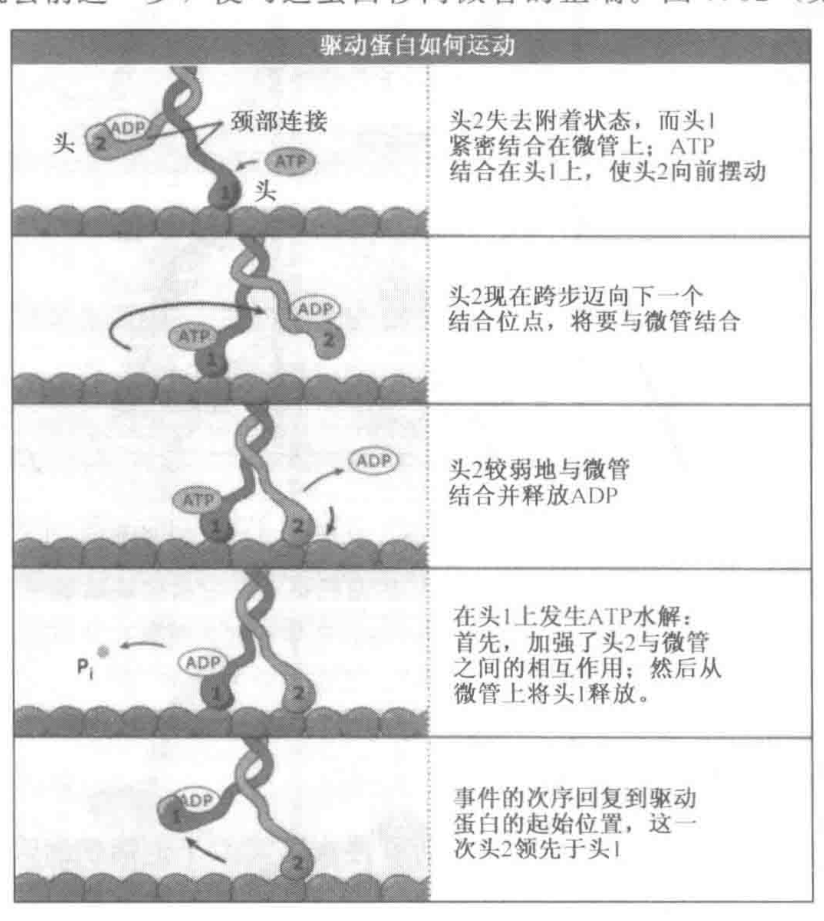


图 7.51　使驱动蛋白在微管上行走的实践次序。图示一个变化发生的几次往返，其中发生在一个头上的事件是对另一个头上事件的反应。注意驱动蛋白总是有至少两个头之一紧密结合在微管上。

一系列静态示意图，描述了两个头怎样发生一系列的协调性事件，以及它们每前进一步之后的角色转换是怎样使其沿着微管移动的。

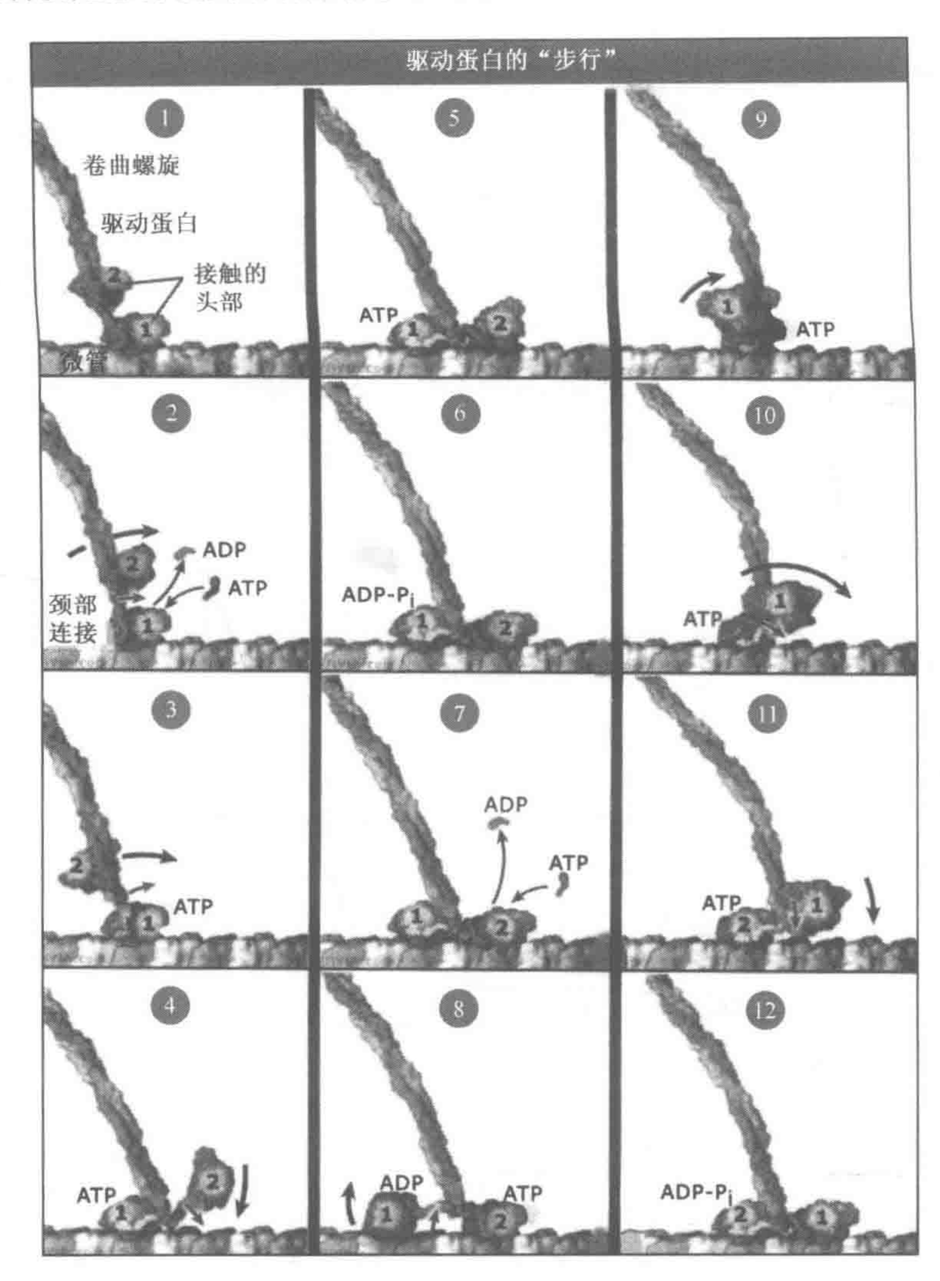


图 7.52 来自一个动画视频的一系列画面，显示驱动蛋白的两个头沿着一根微管的协调运动。驱动蛋白的两个头（标记为 1 和 2）用蓝色显示，卷曲螺旋区域用灰色显示，而颈部连接区在朝向前方时用黄色，朝向后方时用红色显示。为简单起见，这里只显示了微管的一根原纤维。管蛋白的 α-和 β-亚基分别用白色和绿色来显示，正极端朝向右边。动画视频由 Scripps 研究所的 Ron Milligen、Howard Hughes 医学中心的 Ronald Vale 和 FiVth. com 的 Graham Johnson 惠赠。

可以认为驱动蛋白每前进一步所发生的事件次序类似于走钢丝的人在离地面很高的绳索上走动一样。开始时驱动蛋白比较稳定，用单腿站立保持平衡。接着它把另外一条腿晃动到前面（与颈部连接的位置改变），小心翼翼地用它的脚探测绳索（前面的头部最初较弱地结合）。只有当驱动蛋白确保它的前脚合适地定位于绳索上时，它才会把重量转移到那个脚上（新着地的头部得以紧密结合）。接着，驱动蛋白释放它的后脚，抬

离绳索，使自己处于能迈开第二步的位置。和走钢丝的人相比，如果驱动蛋白或走钢丝的人在移动后脚之前没有确保它的前脚是安全的，行走就会失败。那样走钢丝的人就会摔在地上，驱动蛋白就会从微管上飘落。如果驱动蛋白在前面的头结合稳定之前，它后面的头就频繁地从微管上释放，长距离持续的移动是不可能的。

很明显，驱动蛋白移动的机制需要两个头部间稳定的协调。这种协调是怎样实现的呢？一个头是怎样"知道"另一个在干什么的？可能颈部连接是两个头部间通讯的通道。当驱动蛋白的两个头都和微管紧密结合时，颈部连接就会伸展，产生机械应力。很明显这种机械应力会使两个头相互交流，并协调它们的活动（即它们的 **ATPase 循环**）。应力向后面的头暗示：前面的头已经紧密结合了。因此，后面的头可以安全地从微管上释放。应力可能通过确定 ATPase 循环各个步骤的快慢程度完成了头部的协调作用。例如，如果应力使磷酸释放的速度从十分缓慢的程度加速到一个显著的大小，那么直到前面的头部紧密结合时，滞后的头部才会从微管上释放下来。

动力蛋白的运动也基于构象变化的放大，但是结构的改变发生在很大的距离内。驱动蛋白和动力蛋白每走一步的距离都是 8 nm，和单个管蛋白异二聚体的长度相等。驱动蛋白行走得非常"小心"，沿着单根原纤维从一个异二聚体迈向另一个异二聚体。相比较而言，动力蛋白行走得就像在"漫游"，当它向微管的负端穿越时，它随机地踏在原纤维之间。

驱动蛋白移动的机制使它能在微管上持续地移动（即它的移动高度程序化）。例如，在体外实验中，一个两头的驱动蛋白连在一个玻璃珠上（玻璃珠相当于一个很便利的货物），也能够沿着微管行走数百或数千步，在微管上将货物搬运一个相当长的距离，而不至于脱离微管漂移到别的地方。单个驱动蛋白能沿着微管长距离地搬运货物，是因为每个驱动蛋白头部有接近一半时间结合在微管上，而且两个头之间得以协调，至少保证了任一时间内都至少有一个头与微管相结合。两个头总有一个结合在微管上，是在单独起作用的或几个一起起作用（例如移动小泡的那些）的马达蛋白中发现的一种性质。由于它们工作的方式，这些马达蛋白可以很可靠地在细胞内长距离地运输货物。

那些并不总是有一个头和微管结合的马达蛋白——能够使马达蛋白和它的货物很快地脱离微管表面——也有用处。在较大阵列中起作用的微管（如在鞭毛中，见 7.16 *纤毛和鞭毛是运动的结构*）与微管的结合时间比运输小泡的马达蛋白少得多。在动力蛋白阵列中（在鞭毛中），有些头部会结合微管并产生动力。那些完成行进过程的蛋白会迅速脱离微管，而不会因它们的结合妨碍有活性的马达蛋白在同一根微管上产生动力。

很多细胞器在细胞中发生双向移动，它们沿着微管在某一方向移动一段距离，然后拐弯，在相反的方向移动足够的距离。这些细胞器同时与动力蛋白和驱动蛋白家族的一个成员相结合。这就产生一个疑问：它怎么可能在任意方向上完成延长的运动的呢？如图 7.53 所示，有两个可能的模型被用来解释这些细胞器的双向运动。极性不同的马达蛋白可能像在拔河中竞争，其中两种马达蛋白都是有活性的，其中一个能产生更强的拉力（由于它的数目较大）会赢得战局。另一种情形是，马达蛋白的活性被调控，一种马达蛋白失去活性，而另一种马达蛋白有活性。看来细胞中可能出现的是第二种机制，但目前尚不清楚马达蛋白的活性在小泡表面是怎样被调控的。

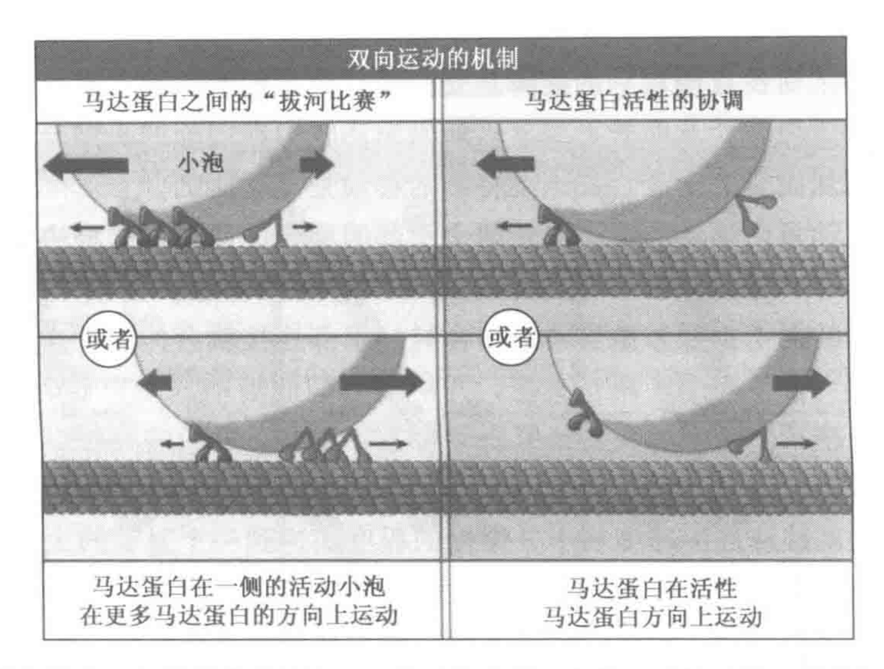


图 7.53 货物沿着一根微管产生双向运动的可能途径。在每一种情况下，正极和负极指向的马达蛋白都结合在小泡的表面。在左边图中，它们同时具有活性，能够产生更大拉力的那一侧（可能因为存在的马达蛋白数目更多）将决定小泡运动的方向；在右边图中，马达蛋白之间进行协调，使在一个时刻只有在一个方向上产生拉力的马达蛋白具有活性。目前的证据显示，细胞中所用到的机制是右边的那一个，但是现在还不清楚马达蛋白受到怎样的协调方式。

7.13 “货物”是怎样装配到正确的马达蛋白上的

关键概念

- 马达蛋白与特定货物的结合是由马达蛋白尾部结构域介导的。
- 和马达蛋白相连的接头蛋白（adaptor）调节马达蛋白的活性，并使马达蛋白和货物相连。
- 正端和负端指向的马达蛋白活性的调节被用于产生细胞器的双向运动。

细胞需要在细胞质中把不同的货物运向特殊的地点。特异性是通过货物与马达蛋白之间的配合来实现的。这就产生了一个问题，正确的马达蛋白怎样结合在货物上以使它运到应该到的地方。膜结构从细胞内部运输到质膜上以及相反的过程说明，需要确定有哪个特异的马达蛋白结合到特定的货物上。朝向正端的驱动蛋白结合离开高尔基体的小泡，并把它们运到质膜或内涵体内，而朝向负端的马达蛋白结合细胞周边的内吞小泡，并把它们运到细胞中央。货物与正确的马达蛋白的结合受马达蛋白尾部结构域的介导。对于马达蛋白的驱动蛋白大家族，该家族任何成员的尾部结构域都不同，可区分出每一个都是特异的马达蛋白。马达结构域则非常相似，它们不造成货物特异性的选择。在此意义上，头部结构域是所有“卡车”（马达蛋白）的引擎，而尾部结构域都是专一的“拖车”，它们可以有选择地运载一组货物。

一般来说，马达蛋白的尾部结构域并不和货物直接结合。典型情况下是一个接头蛋白（adaptor protein）在一端结合膜蛋白，在另一端结合在马达蛋白的尾部，间接地使马达蛋白和小泡相连。例如，离开反面高尔基网到达内涵体的小泡在它的膜上含有甘露

糖-6-磷酸受体。该受体的细胞质结构域与接头复合体（adaptor complex）AP-1 结合，而 AP-1 结合在驱动蛋白的尾部。AP-1 是一个常见的接头蛋白，因为它使网格蛋白（clathrin）和反面高尔基网区域（小泡出芽的地方）相联系。在此情形下，AP-1 使出芽的小泡与马达蛋白相联系，确保新出芽的小泡能够被正确地运输（AP-1 的细节见 4.14 接头蛋白复合体连接网格蛋白和跨膜的待运蛋白）。

接头蛋白也使胞质动力蛋白和细胞膜相联系。研究最深入的接头蛋白是动力蛋白激活蛋白复合体（dynactin complex）。动力蛋白激活蛋白包含 7 个多肽和由 Arp1 组成的短纤维，其中 Arp1 和肌动蛋白非常相似。图 7.54（见图版）显示了一个近期的模型，说明 Arp1 纤维通过和膜的胞质面的血影蛋白（spectrin）结合使动力蛋白和膜泡相连。这种联系与血影蛋白和微丝的相互作用非常近似（血影蛋白和微丝在很多膜上形成网状结构），这也解释了为什么动力蛋白激活蛋白也含有肌动蛋白样纤维。除了使动力蛋白与质膜相结合以外，动力蛋白激活蛋白也帮助动力蛋白与微管相结合，从而使运动成为可能。

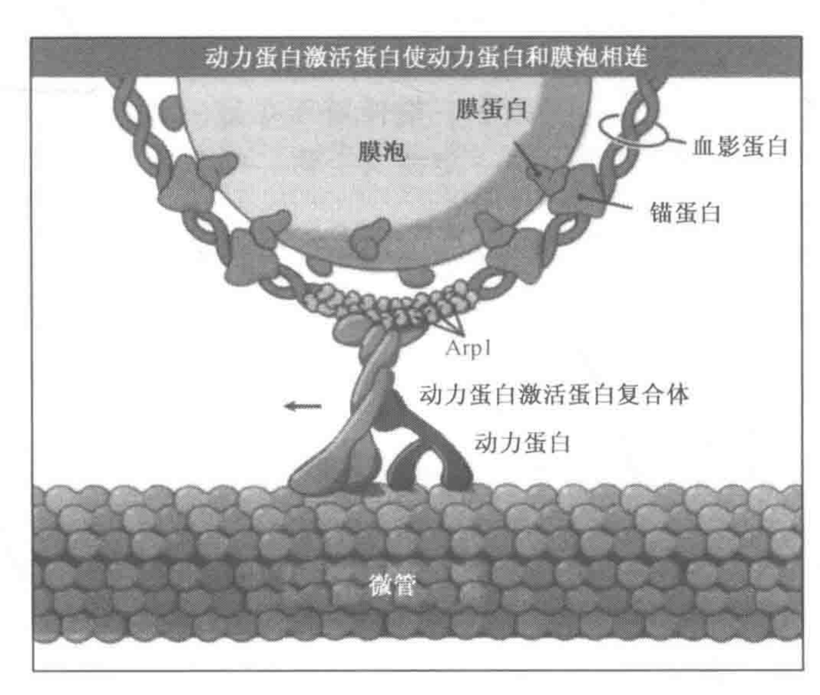


图 7.54　关于动力蛋白激活蛋白复合体（紫色）如何将胞质动力蛋白与膜泡相连的一个模型。动力蛋白激活蛋白复合体的 Arp1 纤维被认为以与肌动蛋白纤维和血影蛋白在其他膜上的相互作用类似的方式与膜上的血影蛋白结合。动力蛋白激活蛋白复合体的其他成分既与动力蛋白又与微管结合。

除了膜泡外，马达蛋白还负责转运其他物质。其他货物包括一些 mRNA 和病毒颗粒，尽管很明显，病毒不是细胞的正常货物。mRNA 的运输使细胞能够将蛋白质的合成限制在特殊的方位，确保 mRNA 能在巨大细胞中达到遥远的位置。例如，在一些神经元细胞中，某些 mRNA 被调运到轴突或树突中，特定属于那些细胞特殊区域的蛋白质在那里合成。单纯通过扩散对 mRNA 的运输过于缓慢而且缺少特异性，而特异性是使细胞构建和保持这样长的特异结构所必需的。和膜泡相似，接头蛋白可以使 mRNA 与马达蛋白尾部相联系。病毒（如 HIV、单纯疱疹病毒和腺病毒）以蛋白质壳包裹的核酸颗粒的方式进入细胞。为了实现复制，病毒颗粒必须到达细胞核，在那里它们利用

宿主细胞的DNA复制机器。病毒一旦进入细胞，就能通过结合动力蛋白加速其复制过程，这使得它们能从质膜直接进入细胞核。

7.14 微管的动力学作用和马达蛋白共同造就了细胞的非对称性组织结构

关键概念

- 动态的微管和马达蛋白协同产生细胞的不对称性。
- 微管和肌动蛋白骨架在一些过程（如细胞运动和有丝分裂纺锤体定位的过程）中协同作用。

细胞器在细胞中的定位和细胞作为一个整体的大致形态，通常有明确的、特意造成的不对称性。细胞能够通过对细胞器和细胞质的特化区域进行排列和定向使其一端不同于另一端，是一种基本的而且特别重要的性质。尽管一个分离的单个细胞没有这种能力也能活下去，但这种细胞完全不能够移动或形成任何较多有高度形态特征和特异化的细胞类型，而这些细胞类型对于形成和维持一个有机体是必需的。例如，成纤维细胞或其他运动细胞必须在一端伸展而在另一端收缩，才能使它们在体内运动并对伤害或感染产生应答。从一定意义上讲，每个细胞两端的不同活动是必须建立而且必须协调的。

细胞的不对称性组织通常依赖于微管的组织方式、微管的动态转变以及微管依赖的马达蛋白在其上的移动。肌动蛋白和中间纤维也参与组织细胞的内部结构，这三种纤维相互作用并相互控制彼此的行为。在本节我们将描述微管骨架成分怎样产生细胞不对称性的例子，包括描述微管和肌动蛋白骨架怎样在一起发挥作用的例子。

当大脑在发育过程中出现沟回折叠（wired）时，每个神经细胞延伸出长长的结构称为轴突（axon），轴突和靶神经元形成突触（synapse），并建立神经元交流的合适回路。在每个延伸的轴突顶端是一个生长锥——高度动态的区域，富含在其表面匍匐的肌动蛋白和微管（见图7.9）。生长锥的移动使轴突延长。当生长锥移动时，它探测周围的区域并通过转向对导航信号产生应答。通过一系列受信号刺激的转向，生长锥被引导到目标，在目标处它停止移动，这样形成了突触。

微管骨架在指导生长锥运动的掌舵过程中发挥着关键的作用。生长锥是一个大的平铺结构，它延伸在它所移动的表面上。在没有外部导航信号时，动态的微管在生长锥后部成核，并以扇形阵列的排布方式生长和缩短。当生长锥遇到信号时，信号只在生长锥质膜的小区域产生，该区域是和信号接触的区域。如图7.55（见图版）所示，细胞相继发生了可观的应答反应。生长锥内的微管通过向信号源生长来发生应答。尽管应答所依赖的MAP尚不清楚，但很可能稳定化微管受信号刺激而局部活化，这使微管在生长相保持更长时间，使它们在信号发源的位置发生积累。图7.56显示了生长锥开始接触后的几分钟内的视频中两个生长锥的微管。在微管发生重新定向并延伸以后，正极指向的驱动蛋白把小泡移动到细胞周边，引起小泡和质膜的融合从而使细胞在一个小区域内延伸，结果造成了生长锥结构的局部不对称性。肌动蛋白骨架为驱动膜朝向微管所标记方向的移动提供了动力。

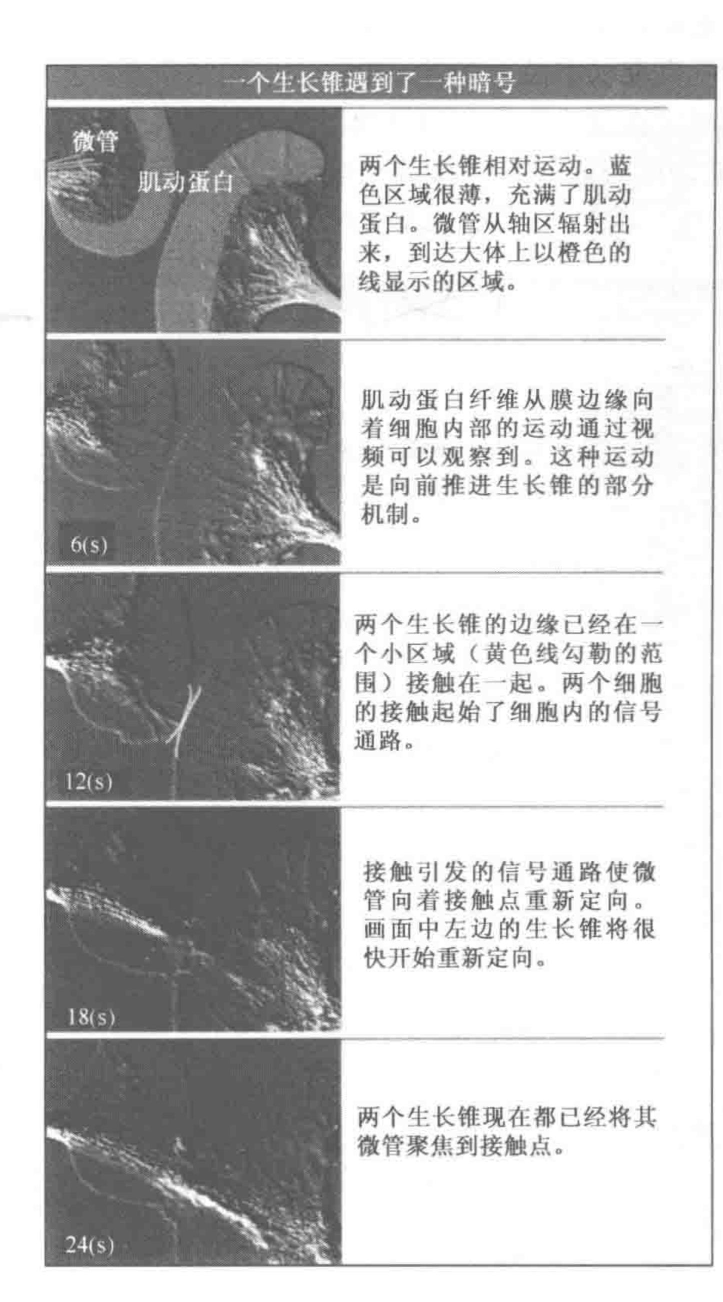


图 7.55　截取自一套视频的一系列画面，显示两个体外培养的神经元的生长锥。当两个生长锥碰撞在一起时它们内部的反应与体内一个生长锥遇到另一个细胞上的一个传导信号（navigational cue）时发生的反应非常相似。每一个生长锥很快地将微管延伸到接触点。照片由 Yale 大学的 Paul Forscher 惠赠。复制自 *The Journal of Cell Biology*，1993，vol. 121，pp. 1369-1383，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

一个传导信号聚焦了细胞骨架

细胞1

细胞2

微管

肌动蛋白

微管+肌动蛋白

图 7.56　在两个生长锥进行了几分钟的反应后其中的肌动蛋白和微管。注意在接触位点，微管被聚焦的程度很大，大量聚合的肌动蛋白也集中在那里。照片由 Yale 大学的 C. H. Lin 和 Paul Forscher 惠赠。复制自 *The Journal of Cell Biology*，1993，vol. 121，pp. 1369-1383，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

微管和马达蛋白造成细胞不对称性的另一个过程在于定位上皮细胞有丝分裂纺锤体的过程中。用来扩展或修复上皮的新细胞的产生需要上皮层的分裂细胞产生两个子细胞，两个子细胞需要具有相同的延伸形态和与其他细胞相同的方向，如图 7.57 所示。细胞总是垂直于纺锤体而分裂的，所以为了使分裂在表皮细胞的长轴上发生，纺锤体必须要在染色体分离前在细胞内从一侧到另一侧确定好取向。然而纺锤体的形成是以随机

定向的方式实现的。为了实现所需要的定向，纺锤体被其星体微管（纺锤体任一端不和染色体相连的微管）所旋转。星体微管是高度动态的，能够不断地在细胞周边搜寻。胞质动力蛋白沿着细胞中部以带状的阵列锚定在细胞膜上。与带状胞质动力蛋白结合的星体微管和动力蛋白/动力蛋白激动蛋白复合体相联系，这样就产生了拉力，拉力使纺锤体移动到正确的指向。

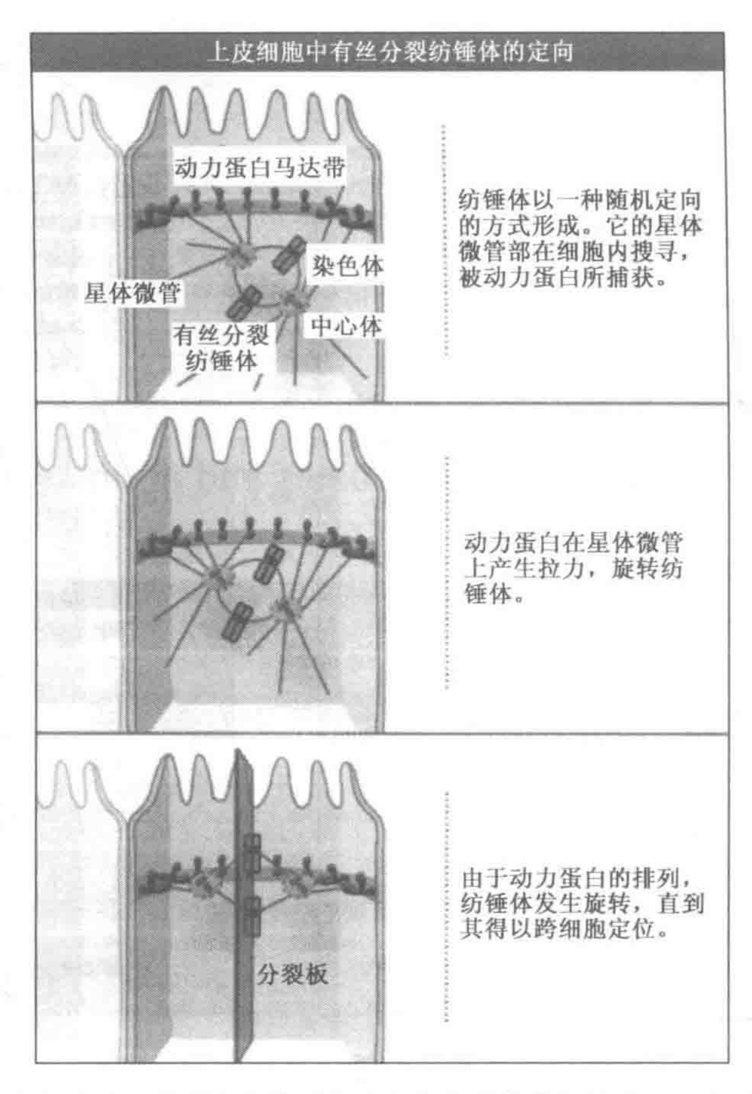


图 7.57　这个细胞是上皮层中延伸到左边和右边的许多细胞之一。在细胞周围呈环状的动力蛋白排列方式保证了纺锤体形成从一边到另一边的定向状态，不管它形成时的定向方式是怎样的。这种定向保证了细胞将要从顶部到底部进行分裂，为上皮层产生两个新的细胞。动力蛋白定位在紧密连接（tight junction）位置——上皮层中，在这样的连接点处相邻的细胞相互接触在一起。

不对称性是怎样产生的？对这个问题了解最深入的例子是关于酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞分裂的研究，这种酵母被用于烤面包和酿造啤酒。图 7.58 显示了酵母通过出芽方式分裂的过程——细胞（“母”细胞）表面的一个小区域向外生长，形成一个在细胞周期进程中不断扩大的芽，并最终生长成子细胞。大约与出芽过程开始同时，母细胞独立的微管组织中心——一个包埋在核膜内的称为纺锤体极体的结构——发生复制，所形成的两个纺锤体极体分开，并移动到细胞核相反的两端，如图 7.59 所示。酵母分裂时并不发生核膜破裂，纺锤体在细胞核内部形成，两个纺锤体极体使微管得以成

核以产生纺锤体。纺锤体极体也在细胞核外面使微管成核。纺锤体形成是随机定向的，并不受出芽位置的影响。

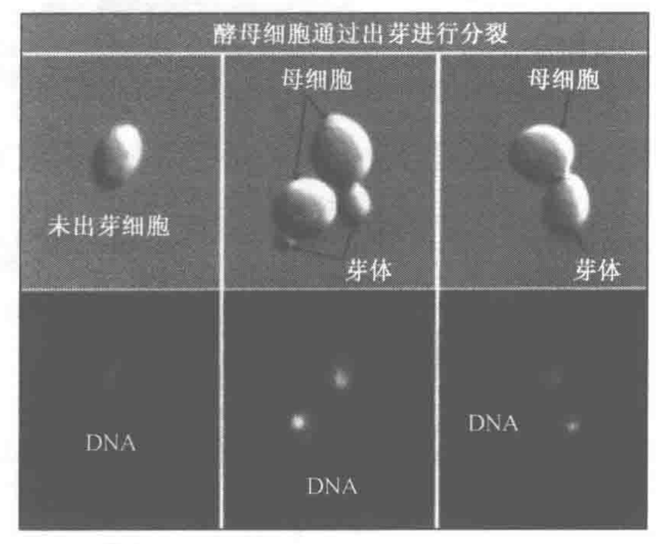


图 7.58 顶部三个画面显示了细胞周期的相继阶段（从左到右）。在细胞周期进行中，芽体逐渐增加其大小直到它们与母细胞一样大小。底部的几个画面显示的是细胞中的DNA。中、下右部的画面显示只有在芽体达到母细胞的大小时，DNA才能出现在其中。照片由 Lehigh 大学的 Robert Skibbens 惠赠。

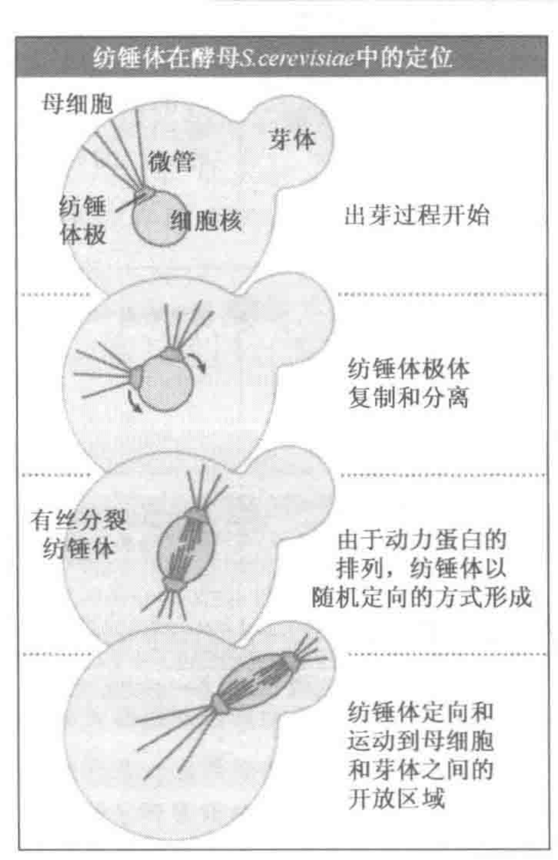


图 7.59 芽殖酵母在它们的细胞核不破裂的情况下进行分裂。纺锤体极体（一种嵌入到核膜内的结构）在细胞质和细胞核内两种情况下进行微管成核，形成有丝分裂纺锤体。纺锤体形成于母细胞中，而且必须定位在母细胞和芽体间的开放区域。纺锤体正确的定位需要它既运动向芽体，又定向在芽体和母细胞之间。

上述一切事件发生在母细胞中。为了使母细胞和子细胞都获得一套染色体，纺锤体必须沿着母细胞与芽体间的轴排列和移动，以使它位于在母细胞与芽体间的开放区域。

对纺锤体的罗列和移动都是由微管来完成的，它们从一个极体的一端延伸到细胞质中。图 7.60 显示了它们是怎样完成这些过程的。在其中一个纺锤体极体中，一个叫做

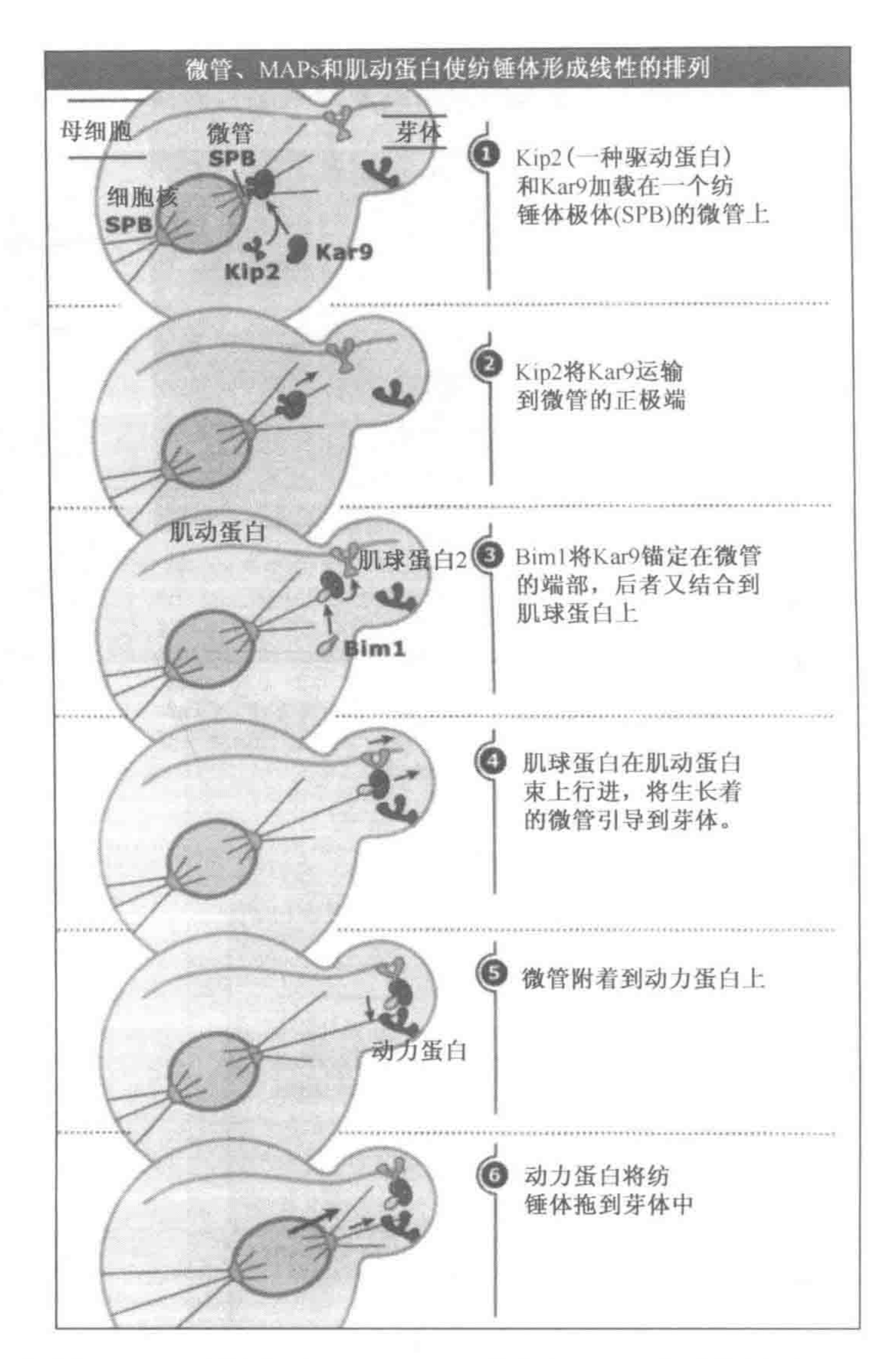


图 7.60　使有丝分裂纺锤体进入芽体中是肌动蛋白和微管骨架之间协调的结果。极性的肌动蛋白束自母细胞延伸到芽体，并用于从两个纺锤体极体之一在正确方向上引导微管。一旦处于芽体之中，微管就可以被动力蛋白捕获。因为动力蛋白附着到了膜上，其作用力就将纺锤体拉到芽体中。如果 Kar9 和 Bim1 能够在两个纺锤体极体上都加载到微管上，这一机制就不可能了。

Kar9 的蛋白质加载于微管上。通过一个驱动蛋白家族的成员（Kip2）的作用，Kar9 从微管的极体处被运输向微管的正端。一旦 Kar9 到达末端，它就通过结合＋TIP（Bim1）稳定在末端。有时候在这个过程中，Kar9 也和高度动态的肌球蛋白（myosin）（一个能沿着肌动蛋白纤维行走很长距离而不掉下来的肌球蛋白Ⅴ家族）结合，促使形成了胞质微管末端与肌动蛋白纤维之间的联系。肌动蛋白纤维以巨大的束状结构从母细胞的细胞质贯穿到芽体，在芽体处它们汇集起来并与芽的顶端皮层相结合。束中的所有肌动蛋白纤维具有相同的极性，所以肌动蛋白纤维束是极性结构，表明了母细胞到芽的方向。肌浆球蛋白沿着肌动蛋白纤维束移动微管的末端，使微管达到芽的位置。一旦到达那里，

微管就与朝向负端的锚定在皮层的马达蛋白（动力蛋白和一种驱动蛋白）相结合。当微管解聚时，这些蛋白质都被拉在微管上并保持在末端。因而，动态的拉力和受控的微管解聚引起的作用力的组合使纺锤体穿越母细胞细胞质移向芽体。

在酵母和上皮细胞中，微管的动力学特征在纺锤体定向和定位方面发挥着主要作用。在两种情况中有一个共同点，即微管的末端必须在细胞皮层上找到一个场所，但是利用微管的动力学特征寻找位点的方式是不同的。酵母中的微管比较稳定，并不是通过搜寻和捕获机制来寻找目标的，该机制需要微管的持续生长和缩短。但是，酵母中的胞质微管能被引导到达目标。当微管的末端被肌球蛋白分子拉向肌动蛋白纤维时，微管的动态不稳定性发挥了作用。当微管末端被移动的时候，它必须能够结合新的亚基同时维持其与肌动蛋白纤维的结合不会断开。因为 Bim1 蛋白的存在这种情况是可能的，该蛋白在哺乳动物细胞中的形式可以使货物悬挂在微管末端。

在酵母中，如果从所形成的两个纺锤体极体发出的胞质微管同肌动蛋白连接起来，纺锤体定位的机制就显然不能发挥功能。如果如此，纺锤体最后就会粘连在母细胞中，其轴与母细胞和芽体的相垂直。避免这一现象的途径很明显是基于纺锤体极体的复制机制的。和中心体一样，在每个纺锤体极体复制以后，就能区分新的和旧的纺锤体极体。和在母细胞和子细胞中心体附近形成的中心粒相似，新的和旧的纺锤体基体的成分是不同的。在酵母中，这种区别被用于保证灭活 Kar9 的蛋白质只存在于新的纺锤体极体中。结果是，Kar9 只能被运载到在原来的旧的纺锤体极体上延伸的微管，因而只有源于那个纺锤体极体的微管才能进入芽体中。

7.15 微管和肌动蛋白微丝间的相互作用

关键概念

- 微管和肌动蛋白纤维在细胞移动和分裂过程中共同发挥作用。
- 通常，微管决定了肌动蛋白在何处和何时装配或产生收缩力。微管通过直接结合或间接的信号转导影响肌动蛋白骨架。
- 这两种骨架系统可以通过连接蛋白结合在一起，连接蛋白使微管和肌动蛋白纤维相结合。
- 微管的动态生长和缩短可以活化一小族 G 蛋白，这些活化的 G 蛋白控制肌动蛋白装配和细胞收缩。

很多动态的细胞功能需要不同的细胞骨架纤维间的协同作用。例如，微管和肌动蛋白纤维相互作用，使细胞在底物上移动或使一个细胞分裂成两个（见 7.14 微管的动力学作用和马达蛋白共同造就了细胞的非对称性组织结构）。中间纤维既可同微管也可同肌动蛋白纤维相互作用以保持细胞和组织的完整性。在本节中，我们将从几个方面研究运动和分裂过程中微管-肌动蛋白的相互作用。

有一些观察研究表明微管和肌动蛋白纤维在细胞内是相互作用的。研究人员大约在 30 年前发现，当加入药物如秋水仙碱（colchicine）时微管就会解聚，细胞就会收缩。收缩是由肌动蛋白骨架和马达蛋白 myosin（肌球蛋白）造成的，这表明微管通常是抵抗或抑制收缩过程的。微管被解聚的细胞也失去了它们的极性形态。对于在表面运动的细胞，通常在细胞的前部，肌动蛋白纤维含量较为丰富，在细胞前部的肌动蛋白发生聚

合产生运动。当微管在这些细胞中解聚时，肌动蛋白纤维不再正确地定位在细胞前部。这些实验观察说明了一个通用的主旋律：微管像一个导航者，它决定了在何处装配肌动蛋白以及在何处肌动蛋白收缩。在此意义上，肌动蛋白被用来提供动力，而微管被用来组织和控制这些动力在哪里发挥作用。通过共同作用，肌动蛋白和微管为特异的细胞功能在正确的地点和时间产生动力。

肌动蛋白和微管骨架在分子水平上是怎样相互作用的？如图 7.61 所示，一种方式是通过一个连接蛋白或一套连接蛋白，它们使肌动蛋白纤维和微管相结合。一些 MAP 通过既和微管结合也和肌动蛋白连接来发挥这些功能，形成这两种骨架的静态联系。神经元的 MAP——MAP2c 就是这样一种和肌动蛋白和微管都结合的蛋白质。在生长的神经元中——当神经元开始形成以及发出长的突起时——将肌动蛋白结合到微管上看起来很重要。肌动蛋白和微管的物理联系可能也是由于马达蛋白而发生的。在这种情况下，连接是动态的，这使一个多聚体和另一个相靠近。这种联系使微管和细胞皮层相结合，正如我们所见到的当纺锤体在表皮细胞中定向和在酵母中时那样（见 7.14 微管的动力学作用和马达蛋白共同造就了细胞的非对称性组织结构）。在这两个例子中，基于微管的马达蛋白锚定在肌动蛋白骨架上，并拉动微管使纺锤体移动到细胞分裂所需要的正确位置。

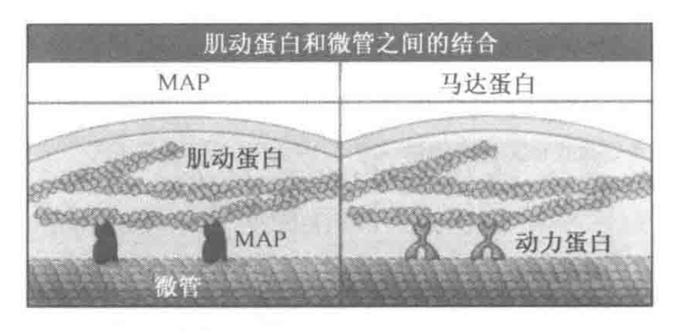


图 7.61　若干种蛋白或蛋白复合体既与微管又与肌动蛋白纤维结合，并将它们连接在一起。图中左边显示的是结合两种类型纤维的一种蛋白质，并将它们简单地维持在一起。这样的连接也可以通过一个马达蛋白的作用而发生，如图中右边的情况。在这种情况下，马达结构域结合到两种类型纤维的其中之一上，而其尾部或结合在尾部的其他一些蛋白质与另一种结合。这种类型的相互作用导致微管和肌动蛋白纤维彼此相对地运动。

微管和肌动蛋白纤维的联系可能也指导生长的微管定位在细胞的特殊位置。在运动细胞中，一些动态微管朝着黏着斑（focal adhesion）处生长，该位置是细胞黏附在胞外基质的位置（见第 8 章肌动蛋白）。这些动态的微管通过附着在接触位点的肌动蛋白纤维束被引导到小的黏着斑处。有人认为结合在微管末端的＋TIP 可能使微管和肌动蛋白束相连，指导微管向黏着斑处生长。微管被靶向细胞后部的黏着部位，这可能产生一个信号引起黏着处被破坏，选择性地使细胞后部从底物上释放。一旦细胞后部游离，细胞就能够收缩，使细胞体向前移动。这个过程的多次重复和细胞前部的延伸相协调使细胞运动。因此，特异地靶向细胞后部黏着处的微管的解聚是微管协助指导细胞运动的一种方式。

肌动蛋白纤维和微管在不发生物理接触的情况下也能一起起作用。现在很清楚，两种多聚体相互释放信号以调节何时和何处另一种多聚体生长。相互发出信号和交流的能

力很关键；这种交流使微管和肌动蛋白可以协调它们的活动并调节每一种多聚体何时和何处建成、拆开，或用来产生动力。尽管微管和肌动蛋白纤维可以相互释放信号，但它们也受信号通路的控制，这些信号通路对来自细胞内或细胞外的信号输入做出应答。这些信号分子除了作用于微管和肌动蛋白纤维骨架，也作用于很多下游靶分子。我们了解最深入的是调节微丝纤维装配和组织的上游信号。细胞中大多数肌动蛋白纤维的组织受到一些数目不多的称为 G 蛋白的蛋白质的调控。当 G 蛋白被活化时，它引起丝状伪足（filopodia，在细胞前部形成的钉状肌动蛋白突起）、片状伪足（lamellipodia，在细胞前部伸出的充满微丝纤维的薄片层细胞质）、收缩性肌动蛋白束——如连接在黏着位点的应力纤维（上述已讨论）的形成——并能使细胞被拉向底物。通常，活化的 G 蛋白刺激（通常是非直接的）肌动蛋白结合蛋白，后者再来调节肌动蛋白骨架。引人注意的是，微管组装或去组装能通过使它们活化或失活来控制 G 蛋白。通过这种方式，动态的微管指导肌动蛋白装配或收缩，而无须与肌动蛋白骨架发生物理接触。

微管和肌动蛋白纤维间的信号转导对于细胞在底物上移动是很关键的。细胞移动时需要在细胞前部持续发生的肌动蛋白聚合来使细胞向前运动，并需要细胞后部收缩以使细胞体向前移动。在细胞的前部，肌动蛋白多聚化产生片状伪足，这种多聚化过程受 G 蛋白 Rac1 的激活。是什么成分在细胞前部活化了 Rac1？为什么细胞保持同一方向的移动呢？我们现在知道，生长的微管能够活化 Rac1，尽管我们还不知道是怎样活化的。Rac1 受微管活化的现象是很值得注意的，因为这证明微管的动力学状态可以在细胞的某一区域活化信号反应链。

微管和 Rac1 之间的交流不只是一种途径。如图 7.62 所示，一旦活化，Rac1 也会给微管发出信号，使它们保持生长状态。活化的 Rac1 间接地关闭了微管去稳定蛋白（癌蛋白 18，oncoprotein 18）的活性，刺激更多的微管生长。通过这种途径，Rac1 和

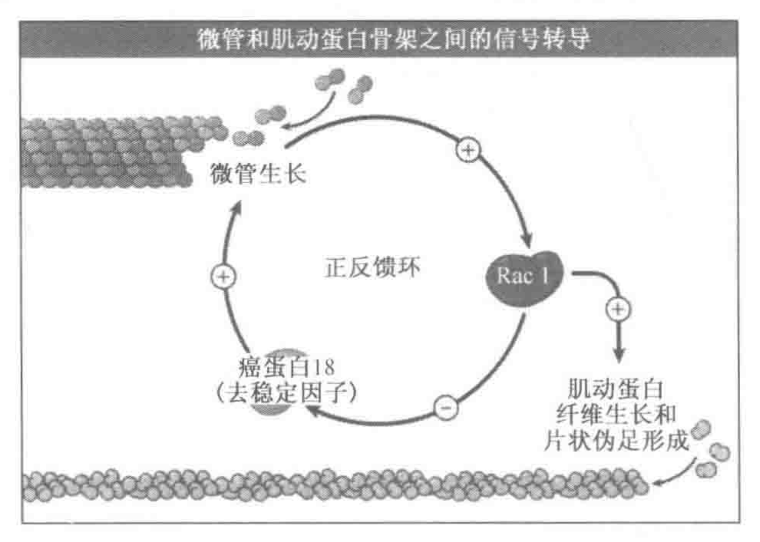


图 7.62　微管的聚合状态（生长或收缩）能够直接改变肌动蛋白的动力学特征和肌动蛋白纤维的组织状态。一个很小的肌动蛋白常常起着中介作用。在这一图解的例子当中，生长的微管激活 Rac1——一种刺激肌动蛋白以形成一个片状伪足所需要的组织方式进行聚合的小型 G 蛋白。活化的 Rac1 也（间接地）关闭微管去稳定蛋白 Oncoprotein 18（癌蛋白 18），因而产生一种正反馈环，协助维持微管生长和丝状伪足形成。收缩的微管激活一种不同的小型 G 蛋白，后者促进形成一种不同类型的肌动蛋白结构。

微管间的交流产生一个局部的正反馈调控环，其中生长的微管激活了 Rac1，活化的 Rac1 又促进了微管生长。这种正反馈环能保持微管向细胞前部的生长并促进肌动蛋白发生多聚化。当肌动蛋白多聚化使前部发生延伸时，Rac1 也能刺激微管在新延伸的区域内生长。因此，由于微管和 Rac1 之间的反馈作用，细胞得以保持极性并在一个方向上持续运动。

解聚的微管也引发一个信号通路。当微管解聚时，它们活化了另一个 G 蛋白——RhoA；活化的 RhoA 刺激应力纤维和黏着斑的装配，并间接地活化基于肌动蛋白的马达蛋白——肌球蛋白。肌动蛋白骨架的这些改变引起细胞收缩。有趣的是活化的 RhoA 也能引发信号通路级联反应，进而通过信号通路稳定了一小族微管，使它们失去动态。目前尚不清楚活化的 RhoA 是否通过稳定一小族微管来限制自己的活性。

我们在微管和肌动蛋白骨架怎样相互交流和进行信号传递方面依然有很多东西需要探索。通过研究这些相互作用以及作为这两种细胞骨架的中介物的信号传递蛋白，我们就能认识细胞运动和细胞分裂的调控方式，并在病变状态下控制这些过程。

7.16 纤毛和鞭毛是运动的结构

关键概念

- 纤毛和鞭毛含有高度有序的核心结构，称为轴丝（axoneme）。
- 轴丝由九个外围的微管二联体（二联管）围绕一对中心微管而组成。
- 放射状轮辐（一个由几个多肽组成的复合体）使外层的微管二联体和中央的轴丝相联系。
- 动力蛋白结合在每个外围微管二联体上，并把它们的马达结构域延伸到相邻的外围微管二联体。
- 动力蛋白的作用使每个外围微管二联体相互滑过，外围微管的结构连接把滑动转化为轴丝的弯曲。
- 驱动蛋白通过把轴丝蛋白运输到鞭毛的远端以参与鞭毛装配。
- 不运动的初级纤毛参与感受过程。

除了在细胞内运输货物，微管还在驱动细胞相对于其环境的运动中发挥作用。如图 7.63（见图版）所示，这个过程由纤毛（cilia）和鞭毛（flagella）完成，它们是从细胞表面伸出的又细又长的像头发的结构。这两种细胞器都是由延伸的质膜包裹着长微管束组成的。通过束中微管的相互作用，这种结构才能够弯曲，使它们能来回鞭打，使液体通过细胞表面流动，如图 7.64 所示。对于一个较大细胞团（如上皮组织）内的静态细胞，这使液体或物体能在组织表面移动。对于单个的无接触的细胞，细胞推动自身在液体中运动（即它能游泳）。纤毛和鞭毛被发现在很多单细胞生物［例如草履虫（*Paramecium*）和衣藻（*Chlamydomonas*，一种双鞭毛单细胞绿藻）］上存在，也在大多数真核生物的精子细胞上存在。在哺乳动物中，纤毛覆盖了一些类型上皮细胞的上部，它们同时拍打，产生在组织表面的纤毛运动波。在气管中这种运动被用来清除黏液和呼吸道产生的碎片；在输卵管中，它使卵细胞从卵巢移动到子宫中；在大脑中它产生脑脊髓环流。

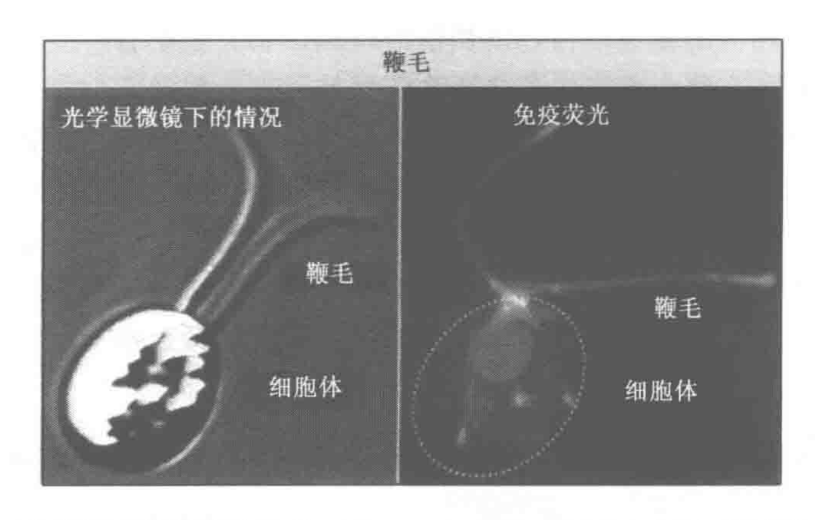


图 7.63　一种单细胞藻类莱茵衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）的光学显微镜和荧光图像。两根很明显的鞭毛从每一个细胞的顶部伸出。微管在荧光图像中显示红色，表明鞭毛是以微管为基础的结构。衣藻细胞通过一种规律性的拍打形式产生的鞭毛运动进行游泳。左图由 Leigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠；右图由 Washington 大学医学院的 Naomi Morrissette 和 Susan Dutcher 惠赠。

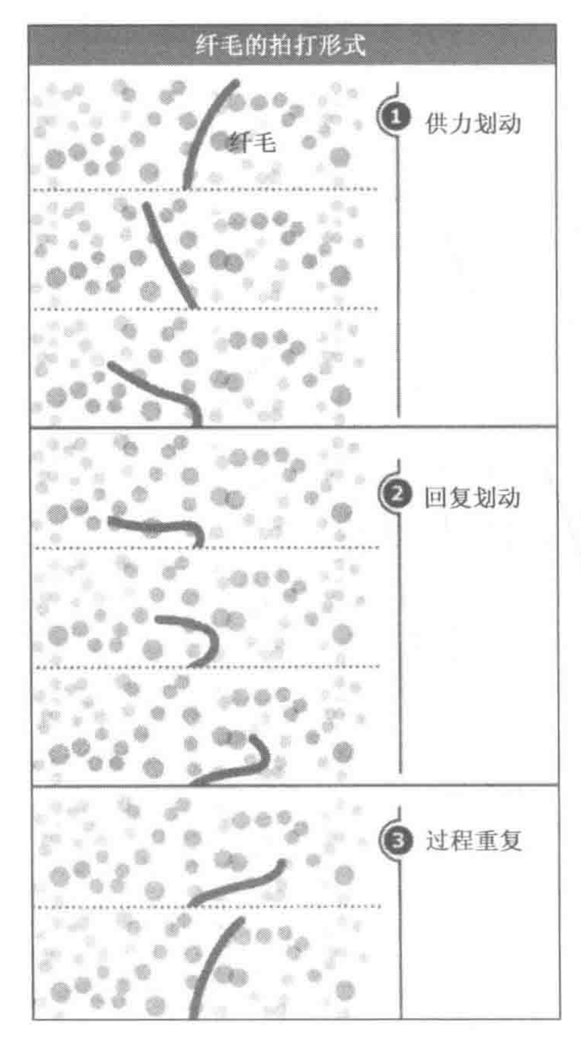


图 7.64　纤毛的拍打过程分为两个部分。在供力划动（power stroke）过程中，纤毛完全伸展，驱动液体流过细胞表面。在接下来的回复划动（recovery stroke）中，纤毛从一端弯曲到另一端，恢复到其一开始的位置准备下一次供力划动。

纤毛和鞭毛有相同的基本结构，以相似的机制运动，但也有一些不同的方面。最显著的是长度的差别和在每个细胞中各自所含数目的差别，以及它们所产生的拍打方式的不同。纤毛较短一些（10～15 μm），每个细胞通常有100个或更多个纤毛。每个纤毛通过在其基部附近的弯曲而产生动力（见图7.64）。纤毛的外部依然坚硬，基部的弯曲使它运动的方式类似于桨在水中滑动。接下来就是回复的一划，在这个过程中，纤毛的弯曲从基部传到顶部，使纤毛对于下一个动力的一击有所准备。图7.65显示了真实的微管拍打运动。在线视频减慢了速度以捕捉运动的各个阶段。事实上，纤毛拍打得非常快（一秒钟有很多次）以至于看起来形成模糊一片的范围。

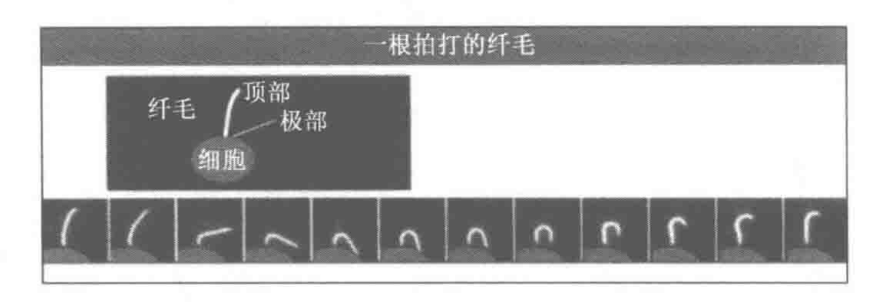


图7.65　一根纤毛的拍打运动——这是利用暗场显微镜（dark field microscopy）观察的结果。注意在供力划动时纤毛围绕其基部的大角度弯折和回复滑动时又进行的非常平滑的展开姿态。纤毛的图像是一个视频截屏。照片由SUNY北方医学中心的D. R. Mitchell惠赠。

鞭毛通常比纤毛要长（10～200μm），典型情况下一个细胞只有1根或少数几根。鞭毛也通过弯曲产生动力；一个S形的运动波从鞭毛的基部传到顶部，如图7.66所示。纤毛和鞭毛的拍打方式都有一个相同的内在机制，该机制基于结构中弯曲的产生。从基部到顶部的运动波传播方式的区别造成纤毛和鞭毛的不同波形。由于这两种类型的细胞器有相同的内涵，我们将主要关注于它们的共同性质，我们用鞭毛（flagellum，pl：flagella）这个词来描述其中任一种的结构和运动，特别指出的纤毛波形运动情况除外。

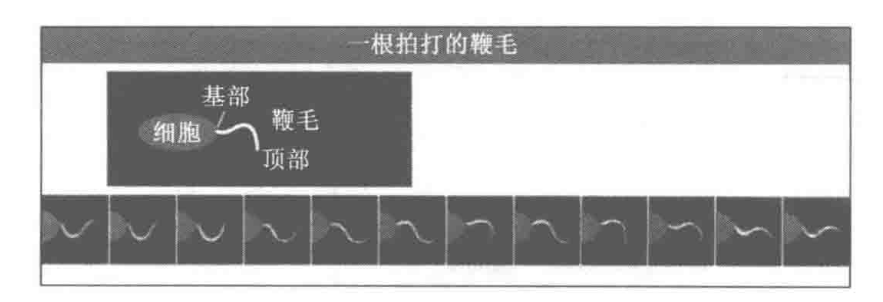


图7.66　一根鞭毛的拍打运动——这是利用暗场显微镜观察的结果。鞭毛的图像是一个视频截屏。照片由SUNY北方医学中心的D. R. Mitchell惠赠。

如果将鞭毛从细胞中取出，它在体外还能继续地进行拍打，这说明该细胞器的运动是单独由其本身造成的；如果存在ATP，分离的鞭毛在去除质膜后仍会继续拍打。这些实验操作的结论证明了动力由鞭毛的蛋白核心和ATP水解的协调作用产生。

鞭毛的核心是由至少含250种不同类型的多肽组成的高度有序的结构。这一结构被称为轴丝。轴丝的结构在有机体中从衣滴虫［即衣藻（*Chlamydomonas*）］到人类体内的鞭毛都非常保守。

轴丝的主要结构特征如图 7.67 所示。最明显的，特别是从横切面看，它是一个组织精细的微管束结构，连续地延伸了该结构的整个长度范围。轴丝结构中排成环状的是 9 个不寻常的**“微管二联体”（doublet microtubules）**，每一个微管二联体由一个传统的含 13 根原纤维的微管和一个由 10～11 个原纤维组成的不完全微管组成；不完全微管和完全微管的管壁相结合（见图 7.67）。在微管二联体环状结构的中央，是两个传统的有 13 根原纤维的微管（中心微管对）。轴丝微管的这种特征性排列被称为**“9+2 结构”**。所有的微管具有相同的极性，它们的正端都位于鞭毛顶端，负端都在基部。各种各样的蛋白质结合在微管上，起着稳定微管的作用。

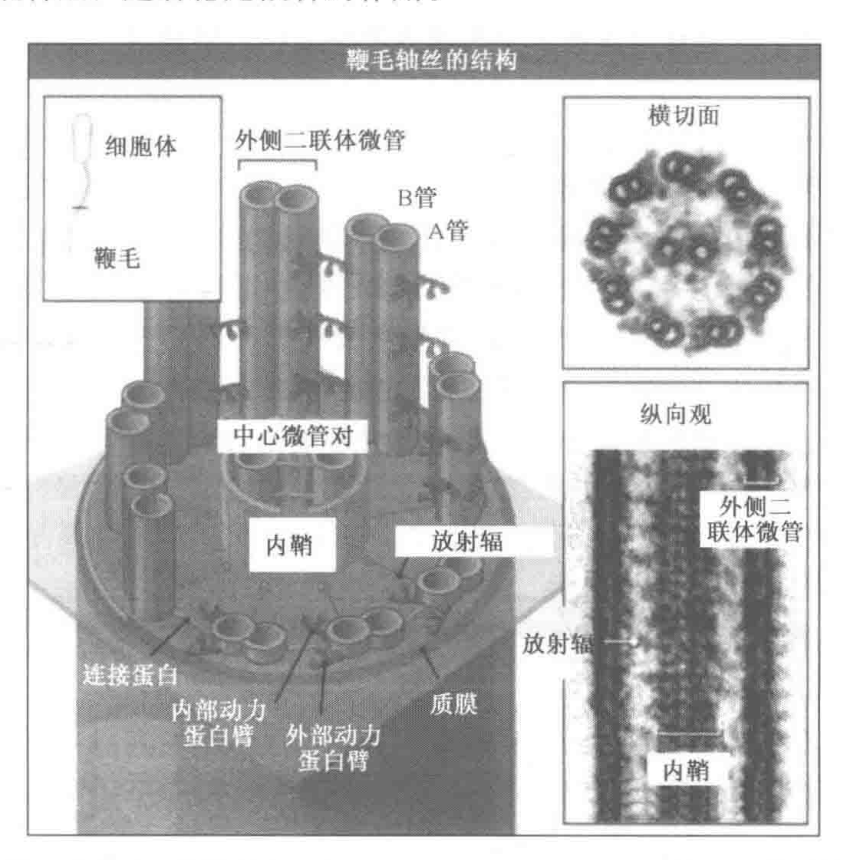


图 7.67　轴丝的结构，可见其中高度有序的微管排列情况。微管同几种不同的连接结构广泛地相互联系。不同类型的联系共同产生了鞭毛的拍打形式。图的右边部分是电子显微镜照片。在横切面上，连接外部二联体微管的内外动力蛋白臂可以被观察到；一个很清楚的放射辐及其头部（在左下方）也能够看到。照片由南伊利诺伊大学医学院的 Gerald Rupp 惠赠。

轴丝内的微管通过几种类型的连接发生广泛的相互联系（见图 7.67）。形成这些联系的蛋白质对于微管组织成一个独立的连接体（coherent unit）是必需的，使它能够运动，并协调它的运动行为以产生波形运动模式。相邻的微管二联体通过一个叫 Nexin [（微管）连接蛋白] 的蛋白质相互连接在轴丝周围。微管二联体也和中心的一个微管对相连，这种连接是通过由可见的辐轴头（spokehead）形成的放射状轮辐的多肽复合体。这两种结构本身相当复杂：轴辅（spok）和辐轴头总共包含了 17 种之多的不同多肽。辐轴头排列在环绕两个中心微管的内鞘（inner sheath）结构周围。动力通过轴丝内的轴丝动力蛋白（axonemal dynein，也称为纤毛动力蛋白或鞭毛动力蛋白）而产生，动力蛋白连接着相邻的微管二联体；尾部结构域结合一个微管二联体的 A 管，头部结构

域结合在下一个微管二联体的 B 管上。由 nexin、放射性辐轴和动力蛋白形成的不同连接存在于轴丝上有规律的间隔处，但有不同的周期。这就很难在轴丝纵切面的电镜图上找到所有的这三种成分。然而，当它们都可见的时候，其结构类似于带有较粗的辐轴和明显的轮毂的车轮。

就像轴丝的其他部分，轴丝中动力蛋白的结构和排列方式也非常复杂。轴丝含有不止一种类型的动力蛋白，每一个都比胞质动力蛋白更大，含有更多不同的多肽。不同类型的动力蛋白含有 1 个、2 个或 3 个马达结构域，而且它们在轴丝上有不同的位置。相邻的微管二联体由两套动力蛋白分子相连，称为内侧臂（inner arm）和外侧臂（outer arm）（见图 7.67）。外侧臂只含有 2 个头或 3 个头的动力蛋白，而内侧臂的动力蛋白只有 1 个或 2 个头。

所有这些连接关系是怎样造成鞭毛的运动和产生拍打行为的呢？最基本的问题是动力蛋白在这个结构中怎样发挥功能。既然它们是马达蛋白，那么运动一定从它们那里起始。为了研究动力蛋白怎样造成鞭毛的运动，可以从细胞中分离鞭毛，并从轴丝周围除去膜。去掉质膜的轴丝被蛋白酶短暂处理，以打断外层微管二联体的 nexin 连接。图 7.68 显示，如果随后加入 ATP，这些微管间会相互滑动而分开。这种滑动由动力蛋白造成——动力蛋白用尾部结构域结合微管二联体，并对相邻的微管产生由微管正端向微管负端的力。在一个完整的轴丝中，动力蛋白并不能通过引起滑动而将外层微管二联体分开，因为它们被 nexin 连接连系在一起。相反，驱动蛋白产生的力被转化为弯曲运动。

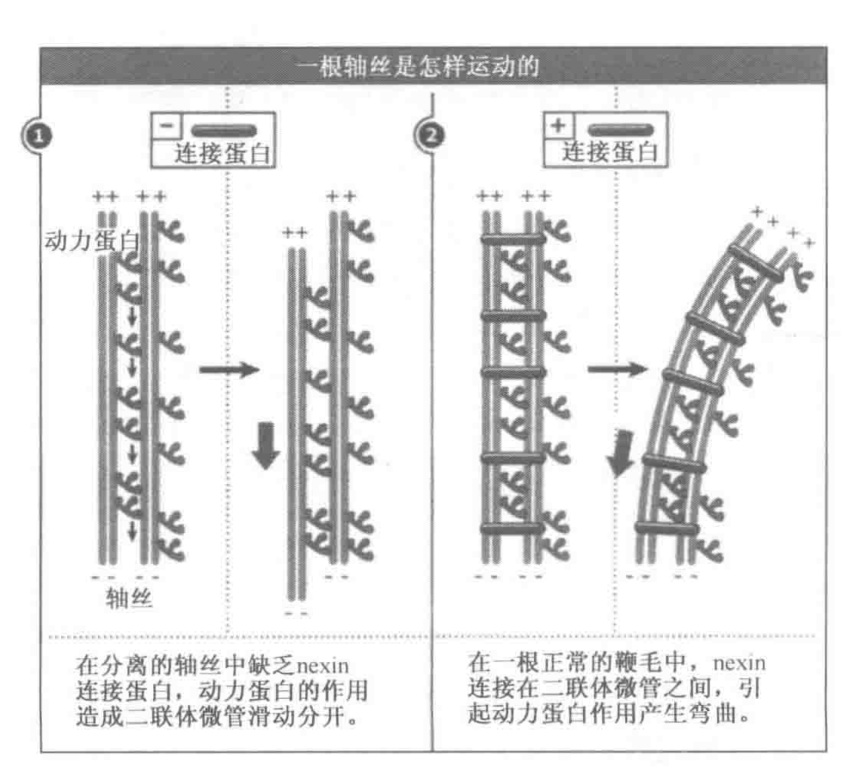


图 7.68　这两个来自一个动画的组图显示由动力蛋白连接的两个外部二联体微管。动画的第一部分描绘了在一个实验中所发生的现象。在实验中从一根鞭毛中提纯了二联体微管，并选择性去除了 nexin 连接结构。动画的第二部分显示了一根完整的鞭毛中发生的现象。二联体微管间 nexin 连接结构的存在造成在动力蛋白施加作用力时鞭毛的弯曲。

纤毛和鞭毛通过传播弯曲运动来产生拍打动作。拍打起始于纤毛或鞭毛的基部，并向远端传播。弯曲之所以发生是因为在任一时刻，动力蛋白只在轴丝的一小部分有活性。动力蛋白被顺次活化，活化沿着长度方向以及轴丝周围依次传播了弯曲。动力蛋白受中心的一对微管和放射性辐轴的调控；缺少这些结构的突变型微管是瘫痪的，不能拍打。在有些生物中，中心的一对微管迅速旋转，当它们旋转时，可能会传播信号给放射状辐轴，然后辐轴再激活动力蛋白。有几种激酶和磷酸酶位于中心的一对微管和放射性辐轴处，而且人们认为中心微管对的旋转传播一个能激活附近动力蛋白的位点特异性信号传播网络。通过特殊动力蛋白异构体的迅速、特异地活化或失活，轴丝能够使纤毛或鞭毛产生拍打行为，并调节拍打的强度和频率。

在鞭毛的基部有一个结构叫**基体（basal body）**。基体有与中心体相同的结构（见7.7 细胞利用微管组织中心已成核的方式启始微管的组装）。每个基体是一个由 9 个三联体微管组成的圆筒形结构，每一个含有由完全的 13 根原纤维组成的 A 微管和 11 根原纤维的 B 微管和 C 微管。基体的 A 微管和 B 微管是轴丝的 9 个外围微管二联体的模板。基体保持和轴丝的基部相连，它是轴丝和细胞体相连的锚。

通过从细胞上去除已存在的鞭毛并观察新鞭毛的生长，可以理解鞭毛是怎样装配的。鞭毛会在不到 1h 内重新生长，并在生长过程中产生功能（即拍打行为）。新鞭毛的生长发生在轴丝微管的正端，并位于每个鞭毛的远端。当鞭毛生长时，鞭毛的装配需要轴丝的必需成分运输到顶端并装配到轴丝上。运输由大的蛋白复合体完成，已观察到该复合体沿着轴丝的外表面运输到顶端，就在质膜的下面。这种运输被称为**鞭毛内运输**（intraflagellar transport，IFT），由驱动蛋白供能。蛋白复合体也能从鞭毛的顶部移到基部（朝向微管的负端），但是这个方向运输的功能尚不清楚。IFT 向细胞体的运输由胞质动力蛋白供能。

尽管多数纤毛是运动的结构，但细胞中也存在发挥不同功能的有关非运动型纤毛形式。原纤毛（primary cilia）就是几乎在所有脊椎动物细胞上发现的非运动性细胞器，只是血细胞例外。和运动的纤毛不同，通常细胞只有 1 根原纤毛。图 7.69 显示了一个非常典型的例子。原纤毛的轴丝缺少中心微管对，因此常被称为具有“9＋0”式结构。从外表看，多数原纤毛很像一根规则的纤毛，它从细胞表面伸出来，就像一根短头发。然而，在有些高度分化的细胞类型中，原纤毛远端是高度扩展的，并装配成一个特异的结构域，可以像一个细胞体那样的大小。例如，在我们的视网膜内，在柱形和锥形细胞中都含有能吸收光的光受体。在这些细胞中，纤毛的顶端扩张成一个大的结构域，称为外节（outer segment），该部分含有充满光受体蛋白——视紫红质（rhodopsin）的膜盘（membrane disk）片层结构。图 7.70 显示了这样一个例子。原纤毛的基部连接了外节和细胞的其他部分，轴丝只比外节起始位点稍长一点。IFT 型运输系统搬运含有视紫红质的膜泡，将其从细胞体内搬运到外节，这种运输很可能对于它的结构形成和维持都是必需的。

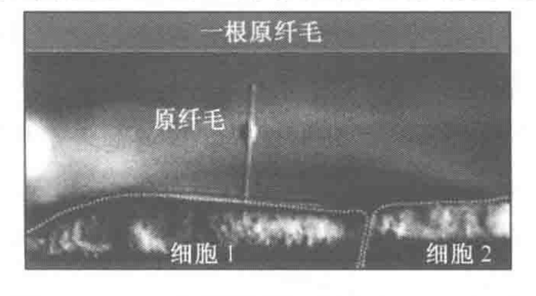


图 7.69 一个细胞表面伸出的一根很明显的纤毛。在横切面上细胞看起来很粗糙，可见其质膜以及相邻细胞的质膜——这里用虚线勾出。原纤毛中突起的部分可能来源于正在轴丝和周围膜之间转运的货物。照片由 Wadsworth 中心的 Sam Bowser 惠赠。

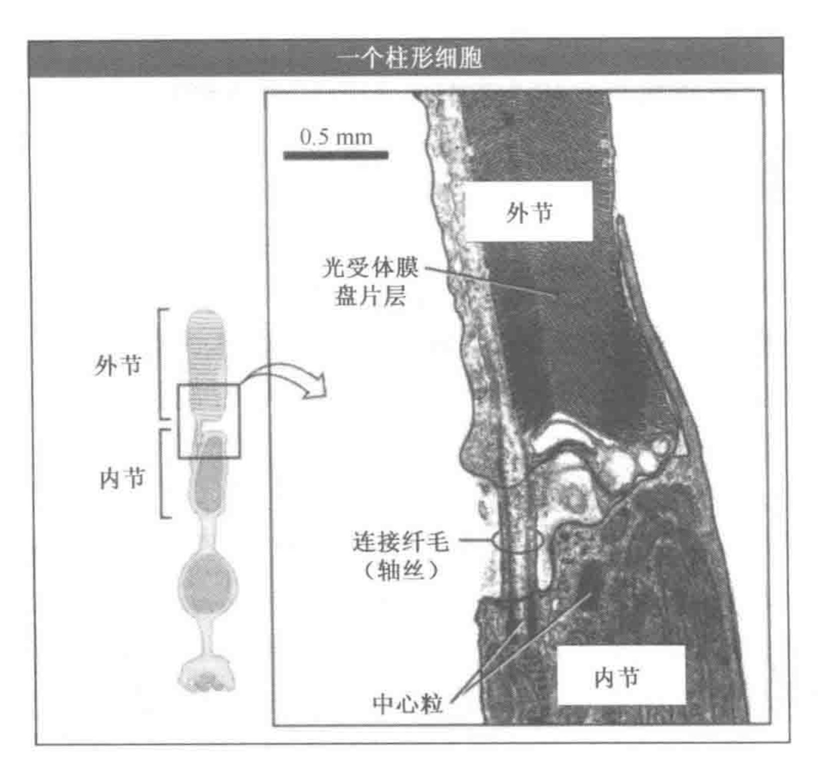


图 7.70　左边只一个完整的柱形细胞的图示，显示了其内、外节及之间的细小连接。右边是两者相连区域的电子显微镜照片（相应于细胞图示中的黑框内的部分）。连接纤毛在它离开内节的那一位点附近一个短距离内看起来很像一根正常的纤毛，但是可以很清晰地看出其顶端伸到了整个外节当中。照片复制自 *Histology of Human Eye*，Hogan，M. J.，Alvarado，J. A.，and Weddell，J. E. p. 425。© 1971，获得 Elsevier 许可。

用柱形细胞的外节作为感光装置是广泛存在于原纤毛中的特性的一个极端例子。有关原纤毛作为感受装置的可能的一般功能，人们才刚刚开始理解；其他含有与柱形细胞相比更适度的不加修饰的原纤毛的一些类型的细胞上也特异地含有各种不同类型的受体。把受体定位到原纤毛上可能使它们成为感受细胞外环境变化的天线，并把这种信息释放给细胞体。

有一些不常见的人类疾病是由于导致纤毛和鞭毛不能运动的突变造成的。遗传了这些突变的病人经常出现持续的呼吸道感染，这是由于他们的无运动性能的纤毛不能够把黏液、被滞留的病原菌和刺激物从呼吸道中运输出去。男性病人通常是不育的，因为他们的精子不能运动。由不能运动的纤毛和鞭毛导致的最广为人知的疾病是 Kartagener 综合征。除了呼吸系统感染和男性不育外，半数 Kartagener 综合征病人具有位置倒错，其内部器官正常的左右不对称性是相反的。人们认为，在发育早期阶段器官形成之前，鞭毛的拍打在胚胎中产生液体环流，并造成所分泌的形态生成素的浓度梯度，这种浓度梯度造成了左右不对称性。如果没有形态生成素的梯度，器官沿着左右轴的分布就是随机的。在鞭毛动力蛋白或参与 IFT 的马达蛋白上具有突变的大鼠中，也存在位置倒错，这说明影响鞭毛运动或装配的突变都会造成发育缺陷。

7.17　展望

1984 年，微管组装和去组装的动态不稳定性被首次描述，同一年又首次发现了驱动蛋白。这两个发现起始了我们对微管骨架怎样装配和马达蛋白怎样产生动力的认识。

发现的快速进程没有丝毫的减慢迹象，最近的一些发现又打开了新的领域，拓宽了我们对微管怎样在多种生物和广泛的细胞功能中发挥作用等方面的认识。

在过去的20余年里，实验工作已经发现大量的与微管相连、调节装配、产生动力或锚定微管到其他细胞器上的蛋白质。尽管我们已了解到微管相互作用蛋白的数量，但很可能还有新的发现等着我们。最近，蛋白质组学方法已经应用到中心体和酵母动粒的研究中，并发现了这些细胞器的所有蛋白质成分。这些新发现的蛋白质中许多很可能也和微管骨架相互作用。从逻辑上讲，下一步工作应当是鉴定这些蛋白质的功能。一旦我们弄明白单个蛋白质都是怎样和微管相互作用的，搞清楚这些蛋白质成分怎样在多种细胞功能协同作用中扮演角色就将十分关键。特别的是，了解MAP和马达蛋白的相互作用，会促进我们了解细胞怎样在有丝分裂期分开染色体，怎样把小泡运到正确的位置或怎样改变细胞形态。

许多MAP（可能还有一些马达蛋白）很可能只在细胞的某一特殊区域内发挥作用。它们在某一处有活性是因为它们只定位在那里吗？如果是这样，它们是怎样到达那里的？MAP或马达蛋白受到调节（因此它们在细胞的某一位置有开或关的状态），是什么确定了开、关信号的位置，并设立了把信号限制在某一区域的分界线？

细胞骨架蛋白是在真核细胞中被发现的，人们曾认为也只有真核细胞才有。现在我们知道原核细胞也有其细胞骨架多聚体——FstZ（微管蛋白同源物）和MreB（肌动蛋白同源物）。FstZ非常像α-和β-管蛋白单体。这些FstZ单体装配成看起来很像微管原纤维的丝状物，它们甚至可以结合并水解GTP，并在细菌细胞中持续地组装和去组装。FstZ多聚体和细菌细胞壁相连，在那里它们帮助正在分裂的细胞分开为两个，这是通过细胞中部的膜缢缩来完成的。FstZ是怎样发挥作用的（还有细菌是怎样分裂的）还是个未知问题。将来FstZ和管蛋白的比较会使人们进一步认识每种蛋白质有怎样的功能以及是什么特征使管蛋白聚合成微管，而FstZ则聚合成为单个原纤维样丝状结构的。这些比较研究可使我们理解细胞骨架何时出现在古老的细胞中，以及它是怎样在真核生物和原核生物中得到进化的。

另一个还没有深入研究的领域是物理动力是怎样影响微管装配动力学的。物理动力可以由马达蛋白在微管上拉动或对着障碍物（如质膜）进行多聚化而产生。当微管到达质膜时，它经常弯曲并形成沿着膜轮廓的走势。其他一些时侯微管也会突出而不是弯曲，如果突出的太远，甚至还会折断。细胞膜或其他一些物理障碍也会抑制管蛋白的添加，阻止微管进一步装配并导致崩溃。当微管遇到物理障碍（如质膜）时，是什么决定了正在聚合的微管是弯曲、突出还是折断或者开始缩短？是在微管上的马达蛋白改变了它的动力学吗？MAP和物理动力是怎样协同作用以调节微管的装配和组织的？

我们对于微管和肌动蛋白骨架怎样在细胞内共同作用还需要更多的了解。这两种细胞骨架多聚体间的相互作用对于细胞运动和细胞极性化有重要作用。微管和肌动蛋白骨架能发生物理上的相互作用，能被其他附加蛋白连接到一起。这两种细胞骨架多聚体也发生间接的交流，通过活化激酶或其他信号分子，也可能还通过物理力来相互传递信号。肌动蛋白纤维和微管间的间接交流能产生一个正反馈环——一种纤维的多聚化释放信号使另一种纤维也发生多聚化。这种正反馈信号是怎样产生的以及它们怎样在生理过程中（如在指导细胞运动方面）发挥作用，目前还在研究中。

现在我们正在研究编码基于微管的马达蛋白和MAP的基因内的突变造成神经形态发生和细胞生长控制缺陷的现象。例如，动力蛋白激活蛋白复合体中一个成员的突变与一种家族性马达蛋白神经元疾病相关联。将来的一个很重要的问题是，MAP和马达蛋白的突变是怎样破坏细胞内的正常运输和细胞骨架的组织的。在未来的几年内很可能会发现更多的与微管骨架蛋白突变相关联的疾病，这会增进我们对微管骨架的改变怎样影响细胞生理和整体健康的认识。

在微管骨架缺陷导致疾病的同时，它也是针对其他疾病的药物开发的靶点。在筛选能够破坏有丝分裂的小分子时，研究者发现了monastrol，它是阻止一种特殊的驱动蛋白的马达活性的小分子，该驱动蛋白的功能仅局限于有丝分裂纺锤体。像monastrol这样的一些小分子可以通过阻断有丝分裂来治疗癌症。当和目前所用的微管结合药物（见7.1导言）相比较时，不和微管结合的monostrol和其他小分子在用于治疗疾病时可能有毒性较低和副作用较少的好处。其他正在研发的药物只和来自有限数目的器官中的微管相结合。尽管管蛋白在真核细胞中高度保守，分离特异地针对真菌管蛋白（或者针对引起疾病的寄生虫，包括造成疟疾的寄生虫）的小分子还是有可能的。

7.18 总结

微管是动态的极性多聚体，它参与细胞的组织、极性化和运动。中心体——动物细胞的微管组织中心——使微管成核并在微管的负端锚定微管。在此意义上，中心体的位置决定了细胞中微管存在的大致方式。通常，微管的正端位于质膜附近，而负端位于细胞中央附近。由于动态不稳定性造成的微管迅速组装和去组装使它们更适应于新的环境，也使它们很容易重新组装为一种新的方式。

微管的主要功能是作为分子马达、驱动蛋白和肌动蛋白的极性轨道。这些马达蛋白结合货物（包括膜泡、细胞器和染色体），并把货物运输到微管的正极端或是负极端。微管的极性组织结构为指导货物运输到细胞中正确的目的地提供了必要的导航信息。

特异的细胞利用微管作为纤毛和鞭毛的主要结构蛋白。9个微管二联体和两个中央单微管形成了轴丝的核心。有其他一些蛋白质使微管二联体和中心微管相连接。轴丝的动力蛋白为纤毛和鞭毛的运动提供动力，这是通过使外围微管二联体相对滑动而造成的。在纵向高度连接的轴丝，滑动力造成轴丝的弯曲；轴丝动力蛋白迅速的开、关状态使弯曲传播到纤毛或鞭毛的顶端。

7.19 补充材料：如果管蛋白不能水解GTP，将会怎样？

关键概念

- 如果微管是达到平衡态的多聚体，它们会解聚得非常缓慢并且不容易重新再组装。
- 管蛋白二聚体在装配成多聚体时会水解GTP，这使微管是一个没达到平衡态的多聚体，它们能迅速地解聚。

由于管蛋白亚单位装配成多聚体后会水解GTP，所以微管是不平衡的多聚体。GTP水解对于微管的装配不是必需的，而是发挥了使微管更容易分解的功能。

如果微管是平衡态的多聚体，不难想到对于细胞来说使微管解聚是多么困难。如果

如此，亚单位在微管末端的结合或失去只是一个简单的平衡态。回想方程 7.1，它描述了微管多聚体形成的速率：

$$dP/dT = k_{on}[\text{tubulin}] - k_{off}$$

在平衡时，多聚体形成的速率是 0，因此如方程 7.2 所示

$$[\text{tubulin}] = C_c = k_{off} / k_{on}$$

只有当游离亚单位的浓度改变时，微管才会发生亚基的净增加或净减少（即长度的增加或减少）。它还揭示了特别的一点，即既然解聚对于细胞内部组分的重组是必需的，造成微管的解聚需要什么条件。当管蛋白亚单位的浓度降到 0 时，就会达到最大的解聚速率（见上述方程 7.1）。我们能计算出微管解聚的时间，用解聚速率为 15 个二聚体/s（GTP 微管蛋白的解聚速度）并估计 1624 个微管蛋白二聚体形成最小微管的数据来计算。利用这些数值，100μm 长（在某些间期细胞中就是这样）的微管需要 3h 才能解聚。然而细胞为了有丝分裂会在几分钟内解聚完所有的间期微管。如果解离速率比较高，很可能微管解聚得更快，但是这也很难保证微管在其第一个位置存在，这是因为解离速率较快就需要较高的临界浓度（见上述方程 7.2）。为了使假想平衡的微管达到细胞中所见的解聚速度，方程 7.1 中的解离速率应当是 540 个二聚体/min。在这么高的解离速率下，临界浓度（方程 7.2）会显著提高。利用上述解离速率，临界浓度会提高大约 36 倍，达到 250 μmol/L——是细胞中管蛋白实际浓度的 10 倍，接近于 ATP 的细胞内浓度（约 1 mmol/L）。细胞中除了管蛋白就没有太多别的东西了！

因此，如果微管是处于平衡态的多聚体，细胞固然有了微管，但为了重新组织微管会非常难以解聚它们。由于解聚微管需要微管和游离管蛋白亚基间平衡态的改变，细胞解聚微管的唯一方式是通过破坏大多数管蛋白！这样的其中一个后果是细胞很难根据环境的改变而改变它们的形态，细胞就会行动迟缓，而且不能够迅速地适应环境。

在管蛋白装配到微管上后通过它们水解 GTP，使微管成为处于不平衡态的多聚体，从而避免了上述问题。和平衡态多聚体不同，非平衡态微管能够迅速地组装和去组装，而且在同一管蛋白浓度下也能组装和去组装。这是因为微管末端失去或获得亚基不再是一个反应或简单的相反反应，如在简单的结合平衡反应中所出现的。相反，结合的是一种物质（GTP-管蛋白），而失去的是另一种（GDP-管蛋白）。两个反应中通过 GTP 水解的能量释放意味着结合和解离速率常数可以不相互依赖，换句话说，其中不管哪一个都为细胞提供方便。进化选择了较高的解离常数，所以细胞能够使微管迅速解离而不用改变管蛋白的浓度，使微管能迅速地重组，给细胞带来更强的适应性。

7.20 补充材料：光漂白之后的荧光恢复

关键概念

- 蛋白质和脂类的荧光标记可以被激光发射器发的非常强的光局部地破坏。
- 光漂白区域的荧光恢复是因为没漂白的蛋白质或脂类移到了漂白的空间范围，改变了有光漂白蛋白质和脂类的区域。
- 光漂白区域内标记微管的荧光恢复需要光漂白微管的解聚和新聚合的整合了未被漂白的荧光标记管蛋白二聚体的多聚化。

光漂白后荧光恢复实验（FRAP）是一种用来测量在细胞内某一小区域内某一种分子或结构与其同类的其他分子或结构所进行的交换的方法。对于单个分子（通常是不属于大结构的脂类或蛋白质），FRAP 指示的是分子扩散的速度和它们哪些部分是动态的。对于是大型静态结构（如细胞骨架纤维）的蛋白质，它指的是这种结构去组装和重组装的频繁程度。

为了进行 FRAP 实验，首先要把感兴趣的带有荧光标记的蛋白质或脂类引入细胞中。细胞用荧光显微镜观察，接着通过把感兴趣的区域通过激光器发射的强光照射以破坏荧光标记[用激光器发射的强光破坏荧光标记的过程称为漂白，因此该技术被称为光漂白(photobleaching)]。在此过程中，只有标记被破坏了，所结合的蛋白质或脂类依然是有功能的（它的任何一部分结构都是完好的），但是这时用荧光显微镜就不能看到它了。如果未漂白的荧光标记分子能够扩散或者装配到漂白的区域，荧光就会在漂白的区域内恢复。

对于微管，在实验中把荧光标记的管蛋白引入细胞中，并等待足够长的时间使它们均匀地整合到细胞中所有的微管内。所用的荧光标签或者是一个与纯化的管蛋白共价相连的小分子化学物质或是 α-管蛋白与绿色荧光蛋白的融合蛋白质。图 7.71 显示，当荧光在一个区域内被破坏后，光漂白区域的荧光恢复需要被漂白微管的解聚和整合上未漂白管蛋白的新微管的装配。荧光恢复的速率与微管周转的速度成比例关系。

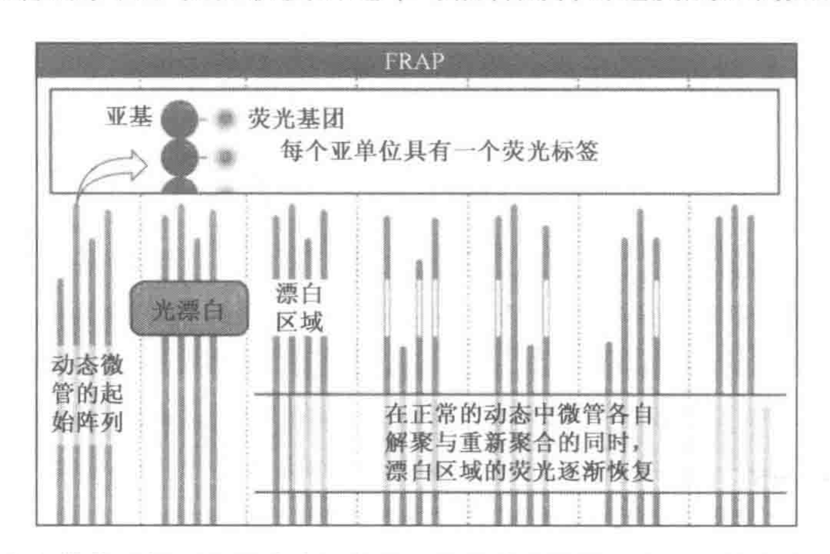


图 7.71　直线代表由带荧光标签的亚单位组成的一根根单个微管。为了开始实验，一个小区域的荧光标签被非常强烈的光线所漂白。如果微管不具有动态的性质，漂白的地方将一直成为信号模糊的区域；如果它们是动态的，正如图中所示，荧光就会逐渐地在相应的区域内恢复，这是由于其间被漂白反应作用过的微管解聚了，代之以添加了未受漂白作用的亚单位的新聚合微管。由于相对于带荧光标签的亚单位总库来说细胞中被漂白的亚单位数量只占很小一部分，新聚合微管在它们的长度上显示出均匀的荧光。因此，在一个区域中荧光恢复的速率也是那里微管动力学特征的一个度量。

7.21　补充材料：管蛋白的合成和修饰

关键概念

- 新的管蛋白的合成受到胞质中二聚体浓度的调节。
- α-和 β-管蛋白需要可溶性胞质伴侣蛋白和其他一些共同作用因子才能正确折叠并装配成异二聚体。

- 管蛋白受到一些翻译后修饰的影响。
- 有些修饰只存在于多聚体中的管蛋白。这些修饰与微管的稳定亚群体的存在相关。
- 在有些生物中，微管中翻译后修饰的管蛋白的存在加强了马达蛋白的结合并为细胞中膜泡运输的调节提供了另一种机制。

α-和β-管蛋白的合成受到负反馈机制的调节，该机制对细胞中存在的管蛋白数量发生应答，如图7.72所示。在翻译过程中，正从核糖体中出来的新生微管多肽会和已经装配的管蛋白二聚体相结合，活化了特异性降解其mRNA的RNase。因此，在有较高浓度管蛋白二聚体的细胞中，管蛋白mRNA较不稳定，因而所合成的新的管蛋白也会较少。相反，含有浓度低于正常水平的管蛋白的细胞会有稳定的微管蛋白mRNA，会合成较多的微管以增加管蛋白的储备。通过管蛋白水平决定管蛋白mRNA的稳定性，细胞能够保证管蛋白二聚体的储备维持在一个浓度范围，在这个浓度范围内，它的微管能正常地发挥功能。

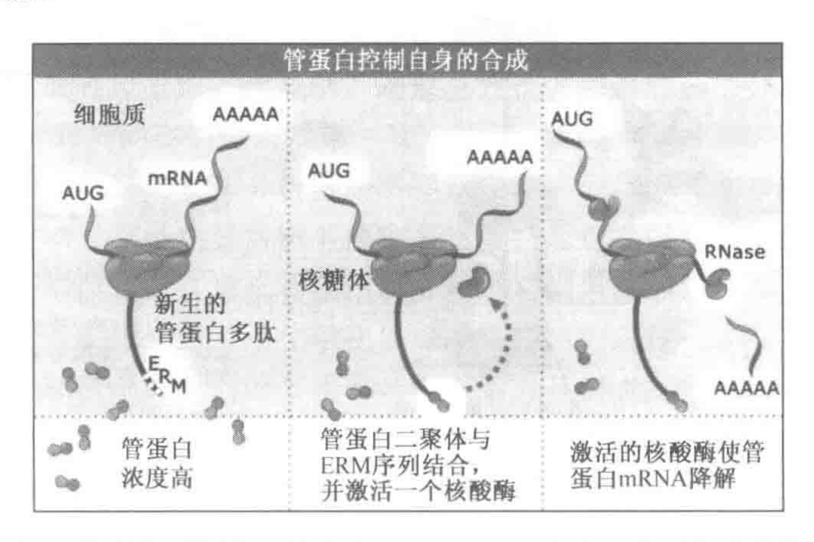


图7.72　一个管蛋白二聚体和管蛋白多肽末端的一个短序列的相互作用导致管蛋白mRNA的降解和管蛋白合成的减少。这种反馈机制维持了细胞质中的管蛋白浓度，使其限制在一个很窄的范围内。本图中只显示了一个管蛋白和一个核酸酶，但也会有其他成分的参与。

α-和β-管蛋白自身不能正确地折叠或装配，还需要其他几种蛋白质，其中有几种是微管特异性的。在翻译后，管蛋白单体首先被胞质可溶性伴侣蛋白CCT结合并折叠，这是一个ATP依赖的过程。然后，其他一些蛋白质组成大的复合体（辅因子A～E）用来把折叠的α和β亚单位装配成异二聚体，如模式图7.73所示。在装配过程的某个时期，每个亚单位结合一个GTP分子。装配好的异二聚体从辅因子复合体中释放需要β亚单位水解它所结合的GTP，但和α亚单位结合的GTP依然不水解。一旦正确装配的管蛋白异二聚体释放，β亚单位就迅速地把GDP替换为GTP，这样二聚体才能够整合入微管。

微管蛋白亚单位是十分多样化的翻译后共价修饰的靶蛋白，包括（α-或β-管蛋白上的）磷酸化，去酪氨酸化（从α-管蛋白的末端去掉酪氨酸残基），以及多聚谷氨酸化和多聚甘氨酸化（分别在α-或β-管蛋白上共价结合谷氨酸和甘氨酸链）。人们很早就认识到，特定的修饰（如乙酰基化和去酪氨酸化）只存在于明显地比大多数微管更加稳定的

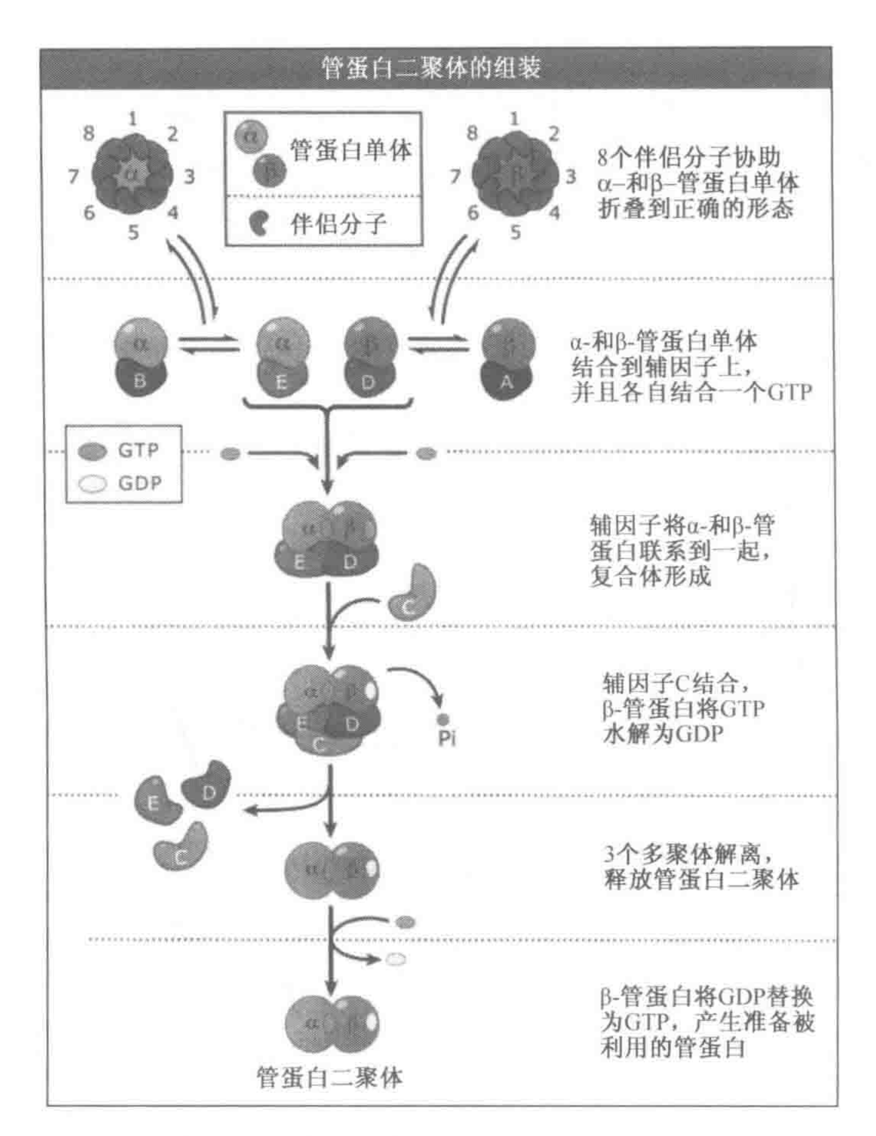


图 7.73　组装一个管蛋白二聚体所需要的步骤。两个管蛋白亚单位分别折叠，然后在辅因子（其中有几个是管蛋白特异的）的协助下联系在一起。此过程可能需要 A、B、C、D 和 E 辅因子，因为管蛋白亚单位的折叠构象直到它们成为一个二聚体的部分结构后才是稳定的。另一种可能是，α-和 β-管蛋白的结构也许需要轻微的扭曲以使它们达到相互适应并拼合在一起。辅因子 C 和由 β-管蛋白催化的 GTP 水解所输入的能量对于组装完成后辅因子的解离是必需的。

一类微管中。在脑组织及纤毛和鞭毛的轴丝的微管中发现了修饰后的高浓度管蛋白。其他一些类型的细胞也有不同含量的修饰后微管。在多数情况下，还不知道修饰是怎样改变微管功能的。

修饰后的管蛋白亚单位的存在为微管的稳定性提供了方便的标记，但是翻译后修饰本身并不发挥使微管更加稳定的功能。目前还不知道一些类型的微管怎样变得更加稳定，但很可能是通过微管在其壁或末端结合特定的 MAP 来得到更加稳定的状态的。一旦微管稳定了，其中的管蛋白亚单位就发生了如前所说的修饰。在某些细胞中，稳定的微管更倾向于被马达蛋白结合，这种结合特异地加强了膜泡在这一类微管上的运输。

7.22 补充材料：基于微管的马达蛋白的运动性分析

关键概念

- 马达蛋白在细胞提取液中依然有活性，这就使它们可以被纯化。
- 马达蛋白可以结合在盖玻片上，为微管在其上滑动提供动力。
- 马达蛋白所包被的珠子可以在微管上运输。
- 利用极性标记的微管能够确定马达蛋白在微管上移动的方式。

基于微管的马达蛋白的发现和分离得益于新分析方法的发展，这些方法使科学家能够在体外（或者在细胞提取物中或者利用纯化的马达蛋白）观察微管的运动。驱动蛋白的发现起始于科学家观察到膜泡能持续地在粗提液（从发现于鱿鱼中的单个特殊的巨大轴突中提炼的未稀释细胞质）中移动。突触提供了有希望寻找这样的马达蛋白的区域，这是由于微管依赖的膜泡运输能够在突触的较大空间内发生（见图 7.1）。从鱿鱼中分离巨大的突触，就像挤牙膏一样，把突触的细胞质部分［神经学家称之为轴索原浆(axoplasm)］放在载玻片上以观察运动。通过分开轴索原浆的各部分以及检测每一部分的运动，Ron Vale 和其同事们分离了第一种驱动蛋白马达分子。

和通常在试管中进行的生化分析方法不同，运动的分析必须在显微镜下进行以观察马达蛋白供能的活动。怎样在显微镜下观察马达蛋白的运动呢？为了检测运动，有必要随着时间跟踪样品的位置，这意味着蛋白质必须以它们天然的状态存在。这就排除了电子显微术，因为它需要每个样品用化学物质深度处理，而这种处理会使蛋白质失活。光学显微镜没有电子显微镜那么高的分辨率，但它却有其优点——它很少需要样品中蛋白质的修饰。因此，它能够用来跟踪需要活性蛋白质的事件，而且可以持续数分钟或更长时间。对于传统的光学显微镜，微管太小了，难以被观察到。然而，这是观察微管依赖的运动或马达蛋白驱动的移动所必需的。这个问题可以通过两种方法使微管可见而得到解决。一种使单个微管可见的方法是用微分干涉显微镜（DIC，一种特殊的光学显微镜）并用视频和计算机方法提高图片质量。图 7.74 显示了用这种方法观察微管的一个例子。另一种方法是，用荧光标记的管蛋白二聚体多聚化为微管，然后用荧光显微镜观察带有荧光的微管。



图 7.74　一根在微分干涉显微镜下观察到并经过电脑增强技术处理了图像的微管。图像虽然是颗粒性的，但微管的位置和长度是清晰的。这种类型的显微镜可以用来测量微管有多长，用来观察它们的运动，或用来观察颗粒物在它们上面的移动。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

令人惊奇的是，测量由马达蛋白造成的运动的实验不需要作为货物的东西。这是由于马达蛋白可结合在玻璃上（显微镜载玻片和盖玻片），而微管则不能结合。马达蛋白

结合在玻璃上，而微管是游离的，因而马达蛋白的活性驱使微管在玻璃表面滑动。图 7.75 和图 7.76 显示了这样的例子。

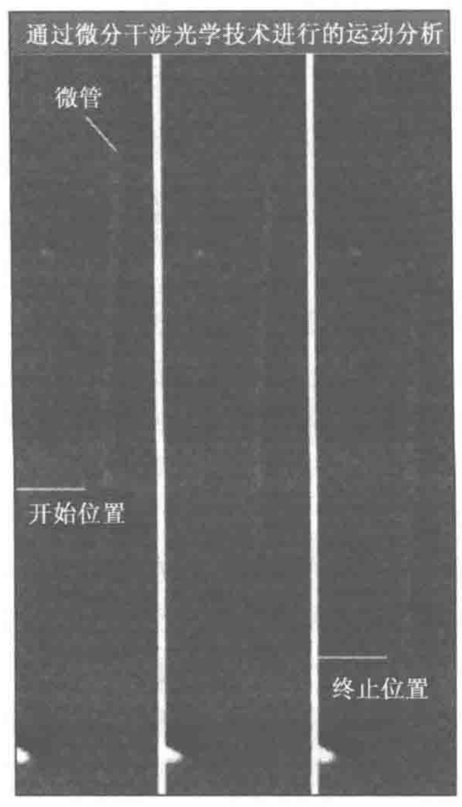


图 7.75　从一系列视频中截屏的一连串图像，显示体外实验中一根微管在一张玻璃的表面滑动。微管通过微分干涉显微镜和图像处理技术来测量。结合在玻璃盖玻片上的马达蛋白为微管的运输提供了动力。照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

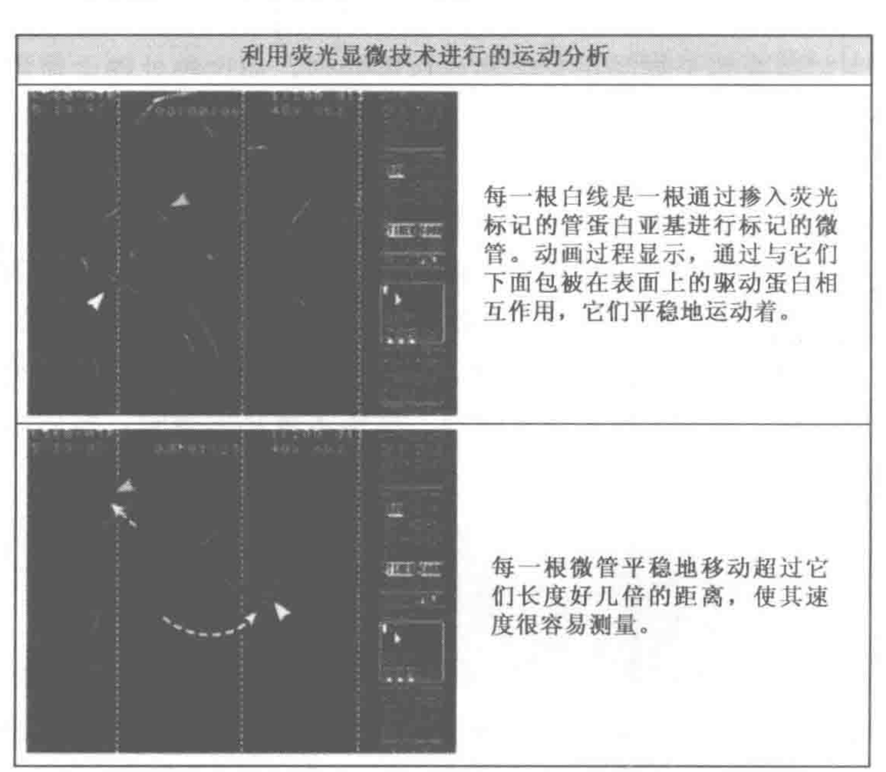


图 7.76　从一系列视频中截屏的两个图像，显示了在玻璃表面上滑动的数根微管。微管是从纯化的管蛋白聚合来的，并掺入了被荧光基团修饰的一小部分管蛋白。驱动蛋白能够简单地黏附在玻璃上，因为其尾部结构域具有正电荷区域，能够与玻璃表面的负电荷相互作用。两根微管分别用深色和浅色箭头指示；它们的运动路径用虚线箭头指示。照片经允许复制自 Milligan, R. 2000. *Science*. 288：88-95。© AAAS. 视频由 Scripps 研究所的 Ron Milligan、Howard Hughes 医学研究所的 Ronald Vale 和 fiVth. com 的 Graham Johnson 惠赠。

这个简单的微管滑动分析实验被用于在纯化第一个驱动蛋白过程中分析它的生化成分，也被通用于基于微管的马达蛋白的研究。一个滑动分析实验的变通策略是利用马达蛋白所包被的玻璃珠或橡胶珠。能够观察到这些包被的球体在微管上的运动。“珠子实验”有一点复杂，因为珠子和微管都必须用光学显微镜观察。在所有这些情况下，微管都要首先用药物 paclitaxel 结合来使它稳定。

马达蛋白的一个关键特征是它们只能沿着微管的一个方向移动。为了理解马达蛋白是朝着微管的正端还是负端移动，我们需要知道微管的极性。在实验中确定微管极性的一个方法是从一个纯化的中心体上装配放射状阵列的微管，然后把它放到显微镜载玻片上；接着，加入被马达蛋白包被的珠子。移向星体中心的珠子朝向负极端，离开中心的珠子移向正极端。另外一种标记微管极性的方法是利用正端聚合较为迅速的性质。为了实现这一方法，首先要制备含有很高比例荧光标记亚单位的短微管，然后用这些明亮的带荧光的微管作为较长微管的成核种子，这在含有较低比例的带荧光的微管溶液中进行。管蛋白分子可加到微管的两端但是更容易结合到它的正端。结果就产生了一些中间有较短的明亮片段的微管和二聚体，但是自其末端依然有清晰可见的延伸片段，如图 7.77 所示。从正端延伸的片段要比自负端延伸的长很多，这样一眼就能判断微管的极性。这些发荧光的极性标记微管可以用于滑动分析实验以判断马达蛋白运动的方向。当解释这些实验时要记住马达蛋白是锚定的，这一点非常重要。指向负端的马达蛋白垫子可使微管在其上面滑行，其负端朝向前面。

几乎所有的运动实验都是上述的某一种分析方法的改进。所解决的问题及探测系统的复杂性和分辨率可能有差别，但是试验的基本原理是相同的。

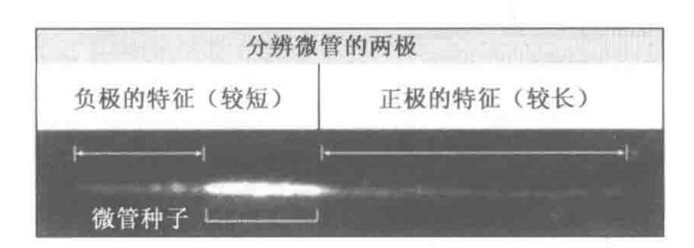


图 7.77 自一段短微管种子生长的一根单一的微管，在其正端有非常高浓度的荧光管蛋白亚单位；在其正负极延伸的长度差异明显可见。标记的微管在这种方法中的应用提供了一条便捷途径，用于确定马达蛋白是通过何种方式沿着微管运动的。照片由 Ludwig 癌症研究所的 Arshad Desai 惠赠。

参 考 文 献

7.1 导言

综述

Jordan, M. A., and Wilson, L., 1998. Microtubules and actin filaments: Dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 10 p. 123–130.

Kries, T., and Vale, R., eds., 1998. Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford University Press.

7.2 微管的基本功能

综述

Gard, D. L., Cha, B. J., and Schroeder, M. M., 1995. Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules, microtubule-associated proteins, and microtubule-organizing centers during amphibian oogenesis and early development. *Curr. Top. Dev. Biol.* v. 31 p. 383–431.

Howard, J., and Hyman, A. A., 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* v. 422 p. 753–758.

7.3 微管是由α-管蛋白和β-管蛋白组成的极性多聚体

综述

Nogales, E., 2001. Structural insight into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 30 p. 397–420.

研究

Song, Y. H., and Mandelkow, E., 1995. The anatomy of flagellar microtubules: Polarity, seam, junctions, and lattice. *J. Cell Biol.* v. 128 p. 81–94.

7.4 纯化的管蛋白亚单位能组装成微管

综述

Desai, A., and Mitchison, T. J., 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 83–117.

Job, D., Valiron, O., and Oakley, B., 2003. Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 15 p. 111–117.

Mitchison, T. J., 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* v.3 p. 1309–1315.

7.6 GTP-管蛋白亚单位组成的帽状结构调节微管的动态不稳定转化

综述

Desai, A., and Mitchison, T. J., 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev Biol.* v. 13 p. 83–117.

Howard, J., and Hyman, A. A., 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* v. 422 p. 753–758.

Mitchison, T. J., 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* v. 3 p. 1309–1315.

研究

Arnal, I., Karsenti, E., and Hyman, A. A., 2000. Structural transitions at microtubule ends co relate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* v. 149 p. 767–774.

7.7 细胞利用微管组织中心以成核方式启始微管的组装

综述

Bornens, M., 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 25–34.

研究

Dictenberg, J. B., Zimmerman, W., Sparks, C. A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F. S., and Doxsey, S. J., 1998. Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* v. 141 p. 163–174.

Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Alberts B., and Agard, D. A., 1995. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing ringsin the centrosome. *Nature* v. 378 p. 638–640.

7.8 细胞中的微管动力学

综述

Bornens, M., 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 25–34.

研究

Komarova, Y. A., Vorobjev, I. A., and Borisy, G. G., 2002. Life cycle of MTs: Persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *J. Cell Sci.* v. 115 p. 3527–3539.

Rusan, N. M., Fagerstrom, C. J., Yvon, A. M., and Wadsworth, P., 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol. Biol. Cell* v. 12 p. 971–980.

7.9 为什么细胞有动态的微管?

研究

Holy, T. E., Dogterom, M., Yurke, B., and Leibler, S., 1997. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 94 p. 6228–6231.

7.10 细胞利用几种类型的蛋白质调节微管的稳定性

综述

Cassimeris, L., 1999. Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 11 p. 134–141.

Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q., 1999. Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models. *Neuron* v. 24 p. 507–510.

研究

Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J., and Walczak, C. E., 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* v. 96 p. 69–78.

Gundersen, G. G., and Bretscher, A., 2003. Cell biology. Microtubule asymmetry. *Science* v. 300 p. 2040–2041.

Heald, R., 2000. A dynamic duo of microtubule modulators. *Nat. Cell Biol.* v. 2 p. E11–E12.

McNally, F. J., 2001. Cytoskeleton: CLASPing the end to the edge. *Curr. Biol.* v. 11 p. R477–R480.

7.11 基于微管的马达蛋白介绍

综述

Gibbons, I. R., 1995. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* v. 32 p. 136–144.

7.12 马达蛋白是怎样发挥功能的

综述

Gibbons, I. R., 1995. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* v. 32 p. 136–144.

Vale, R. D., and Milligan, R. A., 2000. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* v. 288 p. 88–95.

Woehlke, G., and Schliwa, M., 2000. Walking on two heads: The many talents of kinesin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 1 p. 50–58.

研究

Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J., and Oiwa, K., 2003. Dynein structure and power stroke. *Nature* v. 421 p. 715–718.

Gross, S. P., Welte, M. A., Block, S. M., and Wieschaus, E. F., 2002. Coordination of opposite-polarity microtubule motors. *J. Cell Biol.* v. 156 p. 715–724.

Vallee, R. B. and Höök, P., 2003. Molecular motors: A magnificent machine. *Nature* v. 421 p. 701–702.

7.13 “货物”是怎样装配到正确的马达蛋白上的

综述

Goldstein, L. S., 2001. Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 6999–7003.

Holleran, E. A., Karki, S., and Holzbaur, E. L., 1998. The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int. Rev. Cytol.* v. 182 p. 69–109.

Kamal, A., and Goldstein, L. S., 2002. Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 63–68.

Vale, R. D., 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* v. 112 p. 467–480.

7.15 微管和肌动蛋白微丝间的相互作用

综述

Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M., and Waterman-Storer, C. M., 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* v. 5 p. 599–609.

研究

Bayless, K. J., and Davis, G. E., 2004. Microtubule depolymerization rapidly collapses capillary tube networks in vitro and angiogenic vessels in vivo through the small GTPase Rho. *J. Biol. Chem.* v. 279 p. 11686–11695.

7.16 纤毛和鞭毛是运动的结构

综述

Cole, D. G., 2003. The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* v. 4 p. 435–442.

Ibañez-Tallon, I., Heintz, N., and Omran, H., 2003. To beat or not to beat: Roles of cilia in development and disease. *Hum. Mol. Genet.* v. 12 Spec No 1 p. R27–R35.

Pazour, G. J., and Witman, G. B., 2003. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 15 p. 105–110.

Porter, M. E., and Sale, W. S., 2000. The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J. Cell Biol.* v. 151 p. F37–F42.

7.17 展望

综述

Addinall, S. G., and Holland, B., 2002. The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J. Mol. Biol.* v. 318 p. 219–236.

Hirokawa, N., and Takemura, R., 2003. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* v. 28 p. 558–565.

Kirschner, M., and Mitchison, T., 1986. Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell* v. 45 p. 329–342.

研究

Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., and Mitchison, T. J., 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* v. 286 p. 971–974.

Puls, I., Jonnakuty C., LaMonte, B. H., Holzbaur, E. L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M. K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S. J., Brown, R. H., Ludlow, C. L., and Fischbeck, K. H., 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat. Genet.* v. 33 p. 455–456.

Zhao, C., et al., 2001. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* v. 105 p. 587–597.

7.21 补充材料：管蛋白的合成和修饰

综述

Cleveland, D. W., 1988. Autoregulated instability of tubulin mRNAs: A novel eukaryotic regulatory mechanism. *Trends Biochem. Sci.* v. 13 p. 339–343.

Ludueña, R. F., 1998. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* v. 178 p. 207–275.

Rosenbaum, J., 2000. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* v. 10 p. R801–R803.

Szymanski, D., 2002. Tubulin folding cofactors: half a dozen for a dimer. *Curr. Biol.* v. 12 p. R767–R769.

7.22 补充材料：基于微管的马达蛋白的运动性分析

研究

Vale, R. D., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* v. 42 p. 39–50.

梁前进　译

第8章 肌动蛋白

Enrique M. De La Cruz
Molecular Biophysics and Biochemistry Department,
Yale University, New Haven, CT
E. Michael Ostap
University of Pennsylvania School of Medicine, Pennsylvania Muscle Institute,
Department of Physiology, Philadelphia, PA

本章概要

8.1 导言

关键概念

- 细胞运动是所有真核细胞都共同拥有的一个重要的基本过程。
- 微丝参与构成许多亚细胞结构。
- 微丝骨架相关蛋白产生细胞运动所需的力。
- 微丝骨架是高度动态的，响应胞内、外信号的调节而不断地重组。
- 肌动蛋白的聚合推动细胞突触延伸，并驱动某些细胞器运动。

细胞内的**骨架系统**，包括微管、**肌动蛋白纤维**（即微丝）和中间纤维，为细胞提供机械支持并帮助维持一定的形状结构。另外，细胞骨架系统是**细胞运动**、改变形状，以及重置胞内细胞器的一种调控机制。由细胞骨架驱动的位移被称为细胞运动。许多细胞的运动需要两种或者三种细胞骨架纤维网络的共同协作（见 7.15 微管和肌动蛋白微丝间的相互作用）。而且，肌动蛋白纤维在许多细胞功能中起决定性的作用，例如胞质分裂、吞噬作用以及肌肉收缩。

肌动蛋白聚合形成直径约 8nm 的纤维状细丝。这些细丝可以和其他蛋白质交联，从而形成多种多样的细胞结构。图 8.1 所示为以肌动蛋白骨架为主要成分的某些结构。其中包括刷状缘绒毛、感觉上皮的实体纤毛、黏附细胞的**应力纤维**、神经生长锥、锥形的边缘突出（**层型足板**和**丝足**）以及肌纤维细丝。几乎所有含有肌动蛋白的结构都是动态的，并能够响应细胞内和细胞外的信号而重组。

微丝骨架以两种方式产生力和驱使细胞运动：通过肌动蛋白单体聚合成丝和通过肌动蛋白与其分子马达-肌球蛋白家族的相互作用。对于后者，肌球蛋白结合肌动蛋白丝，然后水解 ATP，所释放的能量用来产生力，并推动肌球蛋白与肌动蛋白丝相对滑动，如肌肉收缩或囊泡的运输。而由肌动蛋白聚合所产生的力则被用于在细胞移动过程中驱动原生质膜。

在本章中，我们来讨论在真核细胞中基于肌动球蛋白的运动机制。许多我们对于细胞中肌动蛋白介导的运动的了解来自于对纯化的蛋白质或组分的生物化学实验。从这些实验中获得的信息可以用来构建复杂的细胞运动的模型。因此，我们首先介绍肌动蛋白骨架的分子机制（肌动蛋白的结构、肌动蛋白纤维的组装和解聚，以及细胞中肌动蛋白的调节蛋白）。然后我们讨论在细胞环境中的肌动蛋白以及与它相关的蛋白质。肌动蛋白纤维在几乎每一个分子过程中都发挥了重要的作用。这里我们将焦点集中在由肌动蛋白纤维的聚合所驱动的运动以及由肌动球蛋白驱动的收缩和运输。我们也引用其他章节对于微丝骨架的作用和动态的讨论。

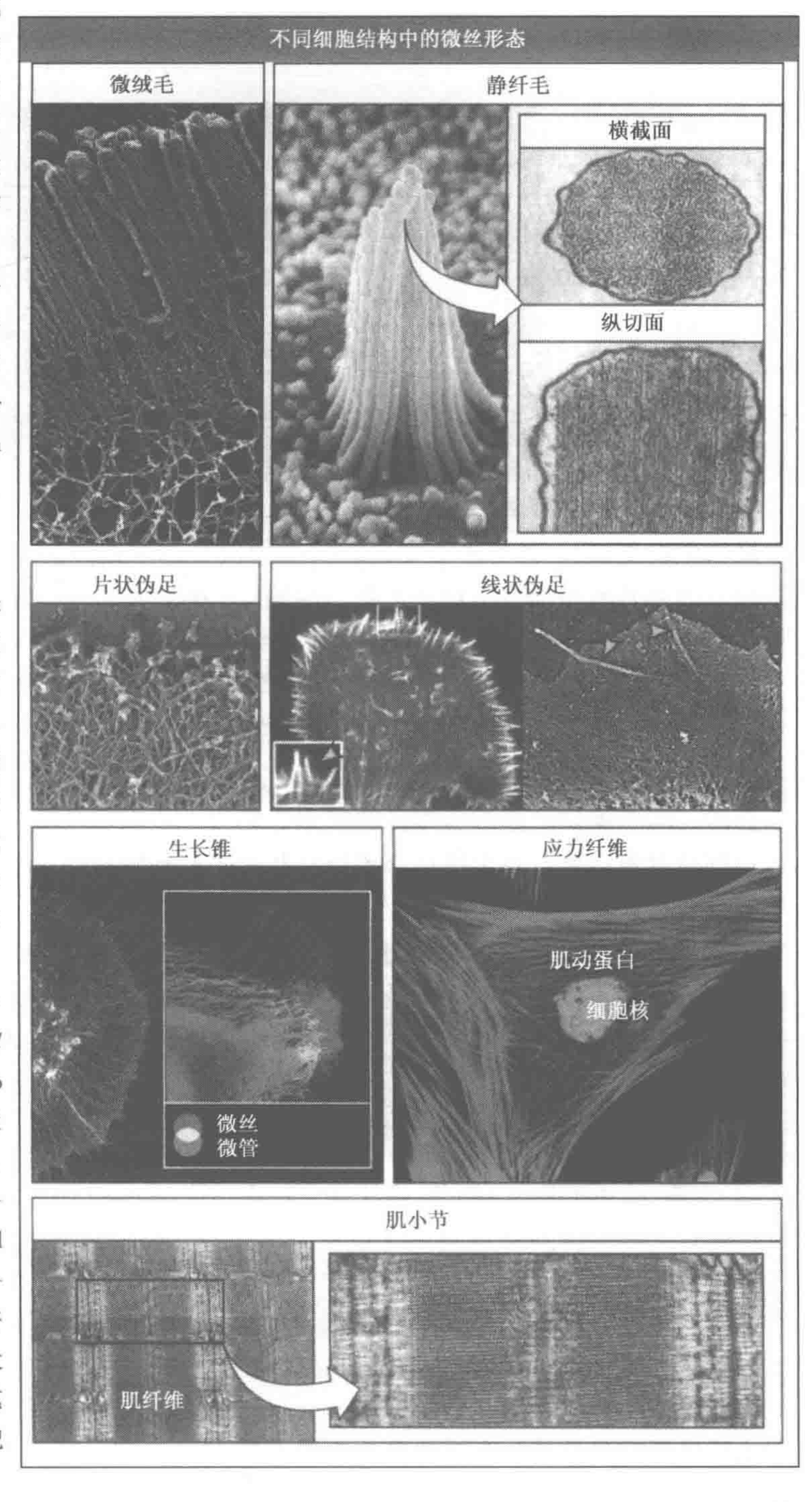


图 8.1 肌动蛋白纤维形成肠刷状缘微绒毛、内耳的实体纤毛、片状伪足、线状伪足、神经生长锥、张力丝和肌小节。微绒毛的电子显微照片复制自 *The Journal of Cell Biology*，1982，vol. 94，pp. 425-443，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。实体纤毛的扫描和透射电子显微照片由 Rockefeller 大学的 James A. Hudspeth 惠赠。复制自 Hudspeth，A. J.，and Jacobs，R. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76：1506-1509。Copyright 1997 美国国家科学院（左）。复制自 *The Journal of Cell Biology*，1980，vol. 86，pp. 244-259，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可（上和右）。片状伪足照片由 Pennsylvania 大学的 Tatyana M. Svitkina 惠赠。复制自 Motta，P. M. *Recent Advances in Microscopy of Cells，Tissues，and Organs*。©1997 Antonio Delfino Editore-Roma。丝状伪足照片复制自 *Cell*，vol. 118，Gertler，B.，et al.，Lamellipodial Versus Filopodial ……，pp. 363-373。Copyright 2004，获得 Elsevier 许可。照片由 Pennsylvania 大学的 Tatyana M. Svitkina 惠赠。神经生长锥的荧光标记照片复制自 *The Journal of Cell Biology* 2002，vol. 158，pp. 139-152，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。照片由 Yale 大学的 Andrew Schaefer 和 Paul Forscher 惠赠。带有荧光标记张力丝细胞的照片由 Michael W. Davidson 和佛罗里达州立大学研究基金会惠赠。肌小节的电子显微照片由 Pennsylvania 大学医学院的 Clara Franzini-Armstrong 惠赠。

8.2 肌动蛋白是一种持续的泛表达细胞骨架蛋白

关键概念

- 肌动蛋白是一个在所有真核细胞中发现的无所不在的重要蛋白质。
- 肌动蛋白的存在形式包括球状肌动蛋白（G-actin）的单体形式和纤维状肌动蛋白（F-actin）的丝状聚合体形式。

肌动蛋白是一种存在于所有真核细胞中的无所不在的蛋白质。它是高度保守的；物种间的蛋白质序列约有 90%的同源性。另外，原核生物也表达与肌动蛋白类似的结构高度保守的蛋白质（见 16.16 *原核细胞分裂涉及形成复杂的细胞动力环*）。肌动蛋白占肌肉细胞中总蛋白质量的 20%，并且在许多非肌肉细胞胞质中的浓度大于 100 μmol/L。

许多有机体含有多种能够编码不同亚型肌动蛋白的肌动蛋白基因（例如，人类有 6 个肌动蛋白基因）。在脊椎动物中，肌动蛋白有三个亚型：α、β 和 γ。这些亚型有着非常相似的氨基酸序列但是功能上各不相同。α 亚型大部分在肌肉细胞中表达并且是收缩结构的一部分。β 和 γ 亚型主要在非肌肉细胞中表达。

肌动蛋白以单体（或 **G-actin**）的形式存在或以由单体聚合成的线形聚合物（被称作 **F-actin** 或微丝）的形式存在。由于单体肌动蛋白可以结合或脱离微丝的末端，单体和纤维都是处于可逆的化学动平衡状态。在细胞中，肌动蛋白聚合是被很多蛋白质严格调控的，这些蛋白质或可与单体肌动蛋白结合，或可与纤维状肌动蛋白结合。这些肌动蛋白的结合蛋白调控着单体状态和丝状状态之间的转换（见 8.7 *肌动蛋白结合蛋白调控肌动蛋白的聚合和组装*）。

有许多种肌动蛋白相关蛋白（Arp），它们在整个结构上都与肌动蛋白相似。例如 Arp1，是一个蛋白复合体的组分之一，该蛋白复合体将微管马达蛋白-动力蛋白（dynein）连接到膜上（见 7.13 *“货物”是怎样装配到正确的马达蛋白上的*）。在本章的后面，我们将会讨论一个包含 Arp2 和 Arp3 的蛋白复合体在调控肌动蛋白聚合中的功能（见 8.9 *成核蛋白控制细胞肌动蛋白的聚合*）。

8.3 肌动蛋白单体与 ATP 和 ADP 结合

关键概念

- 肌动蛋白单体是一个有四个亚结构域的 43kDa 的分子。
- 一个核苷酸和一个二价的阳离子在单体的缝隙处可逆地结合。

肌动蛋白单体是一个结合有一个核苷酸和一个二价阳离子的 43kDa 的蛋白质。它整个的形状可以用由一个裂缝隔开的两瓣来形容，它的 X 射线晶体结构如图 8.2 所示。每个瓣由两个亚结构域组成。这四个亚结构域被命名为亚结构域 1～4。延伸在亚结构域 1 和 3 之间的两条链连接了两个瓣。这些链共同地作为一个接点，允许这两个瓣相互联系地移动。

一个核苷酸（ATP 或 ADP）以及一个二价阳离子（钙或镁）结合在肌动蛋白单体

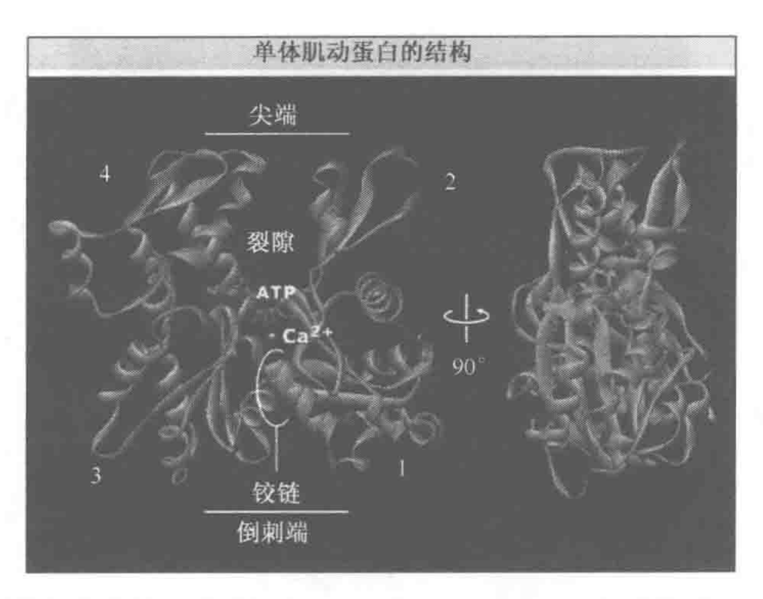


图 8.2 肌动蛋白单体的 X 射线晶体结构，用带状图展示蛋白质分子。亚结构域标记为 1～4。图像用 Protein Data Bank file 1ATN 生成（数据来自 kabsch，W.，Mannherz，H. G.，Suck，D.，Pai，E. F.，Holmes，K. C.，Atomic structure of the actin：DNase Ⅰ complex. *Nature* 347：37-44，1990）。

的中心，深藏在亚结构域 2 和 4 之间的裂缝里。结合的核苷酸被认为关闭了两个瓣之间的裂缝。核苷酸在肌动蛋白单体上的结合是可逆的，并且结合的核苷酸与溶液中自由的核苷酸互相交换。因为肌动蛋白结合的 ATP 比 ADP 更紧密，所以 ATP 表现出比 ADP 更高的浓度，且细胞质中 Mg^{2+} 的浓度远高于 Ca^{2+} 的浓度，所以在细胞中 MgATP 占据了肌动蛋白单体的核苷酸结合位点。

8.4 肌动蛋白纤维是极性结构聚合物

关键概念

- **当一价的和二价的阳离子达到生理学浓度时，肌动蛋白单体开始聚合成丝。**
- **肌动蛋白纤维是极性结构，两端是不相同的。**

根据一价的和二价的阳离子在细胞中的浓度，肌动蛋白单体自我聚合并聚合形成一个直径约 8nm 的纤维。聚合是可逆的，单体持续地加入或离开纤维的末端。这种装配和解聚为基于肌动蛋白聚合的细胞运动提供驱动力。

图 8.3 和图 8.4 所示为单体以“由头至尾”的形式装配成纤维，如此，纤维中所有的亚基都具有相同的方向。如图 8.3 和图 8.5 所示，一个肌动蛋白纤维像一个右手螺旋的双链串珠。这些性质已经由电子显微镜揭示。因为单体是结构极性的（如图 8.2），所以纤维也是极性的，也就是说，纤维的两端是不同的，它们分别被叫做**倒刺端**（barbed）和**尖端**（pointed）。这种极性对于细胞中的定向运输以及极性的细胞形状的建立是十分重要的。

暴露亚结构域 1 和 3 的肌动蛋白纤维的末端是倒刺端，而暴露亚结构域 2 和 4 的末端是尖端（如图 8.3）。倒刺端和尖端的命名源于肌球蛋白结合到肌动蛋白纤维上所形成的形状。由于肌动蛋白纤维是螺旋的和极性的，当在电子显微镜下观察时，结合上去

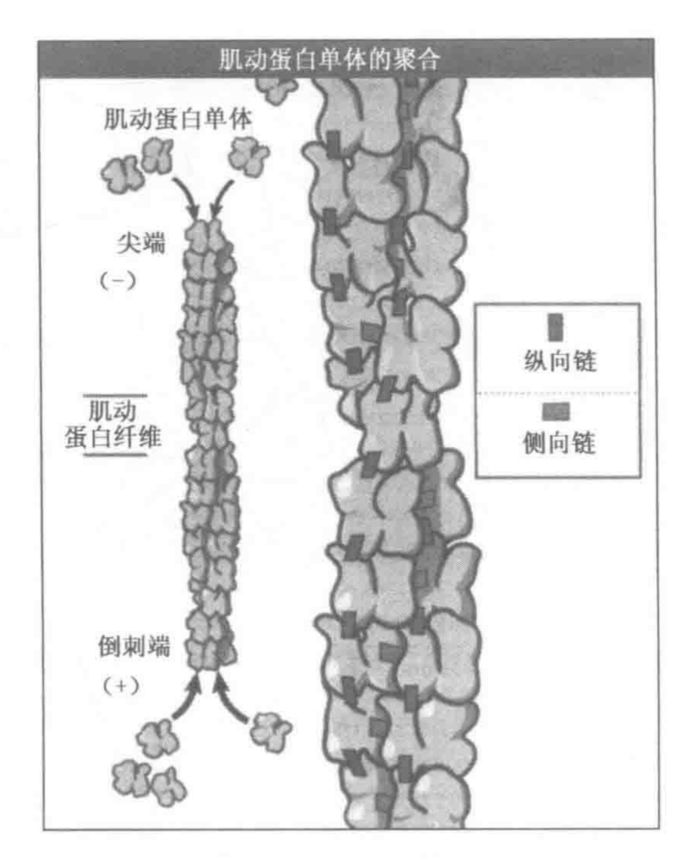


图 8.3 肌动蛋白单体由头至尾装配成极性双链纤维。

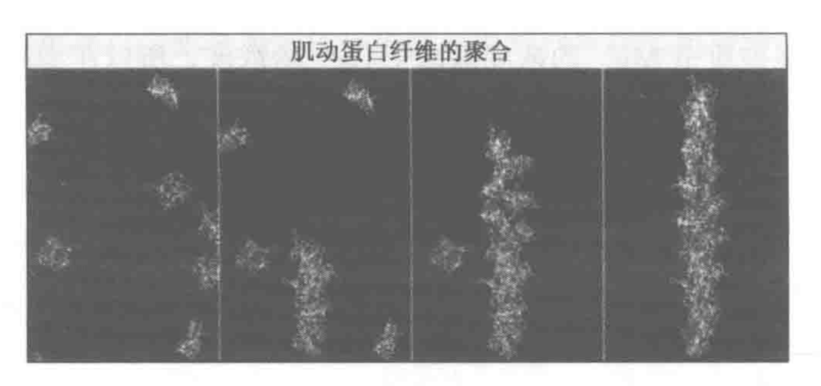


图 8.4 肌动蛋白单体聚合成肌动蛋白纤维的动画截图。图片由 Max Planck Institut für Medizinische Forschung 的 Kenneth C. Holmes 惠赠。

的肌球蛋白就像箭头（如图 9.8）。肌动蛋白纤维的倒刺端和尖端也被叫做正（+）端和负（一）端，分别与微管的正负末端的命名法相对应（见 7.3 微管是 α-管蛋白和 β-管蛋白组成的极性多聚体）。

在一条肌动蛋白纤维中，每一个肌动蛋白亚基与四个相邻的亚基相连：与自己所处同一股的前后两个（纵向接触）以及另一股上的两个（横向接触）（如图 8.3）。这些接触帮助肌动蛋白纤维变得牢固。此纤维是高度抗热力剪切的，可以聚合成长达数千个亚基的长度。纤维的钢性较强，极度的弯曲会导致纤维断裂。长纤维（>15 μm）常常是弯曲的，而短纤维（<5 μm）没有表现出很大的曲率。

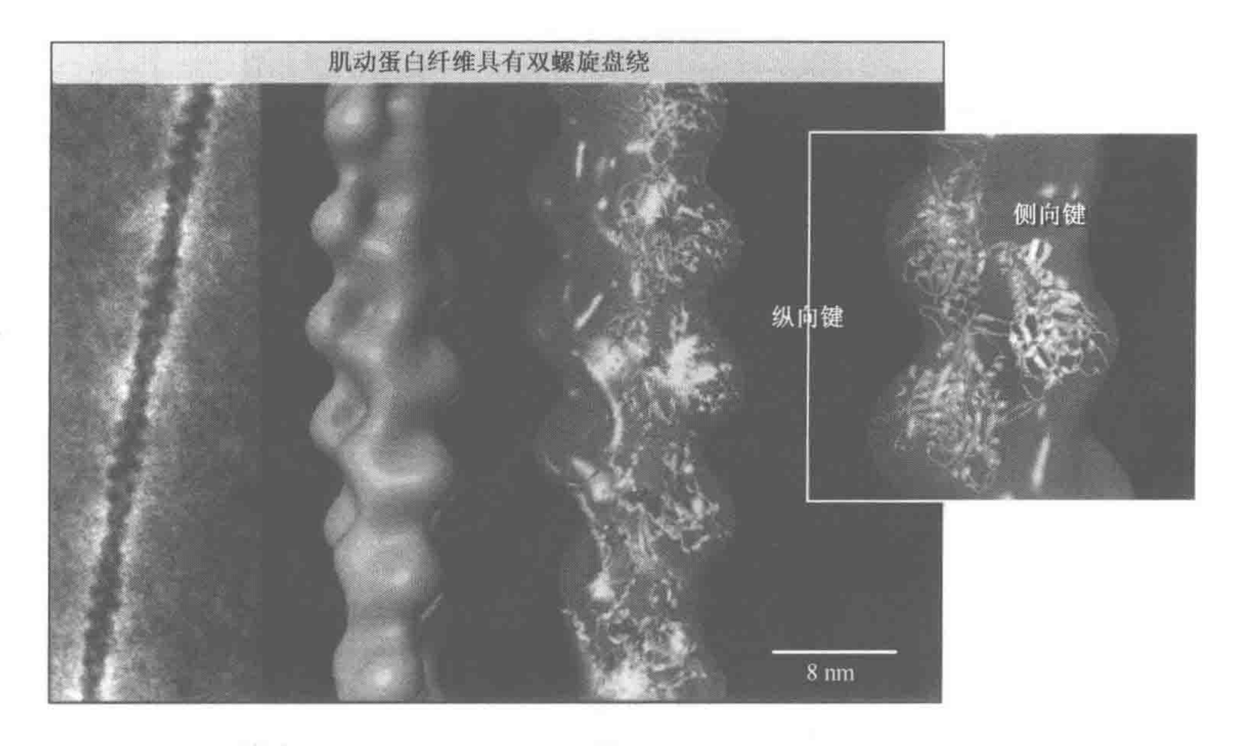


图 8.5 (左)肌动蛋白纤维的电镜照片。(中)肌动蛋白纤维电镜照片的三维重现模型。(右)包含肌动蛋白单体原子结构的三维重现模型，显示肌动蛋白纤维一条链上的亚基分布。照片由Basel大学的Ueli Aebi惠赠。

8.5 肌动蛋白的聚合是多步骤、动态的过程

关键概念

- 体内肌动蛋白的聚合是一个包括成核和延伸的多步骤过程。
- 同一肌动蛋白纤维的两端的单体结合率是不同的。
- 肌动蛋白纤维的倒刺端是快速增长的末端。

细胞通过延伸它们的前沿和收缩后缘来进行移动。一个移动的细胞的突触可以分成薄片状伪足和线状伪足两种。一个薄片状伪足是一个薄的、膜包围的、包含许多分支的、刷状的肌动蛋白纤维网络的片状延伸（如图 8.1)。相反，线状伪足类似于手指，是由膜包围一束平行的肌动蛋白纤维的突出物（如图 8.1)。薄片状伪足和线状伪足这两种突出都需要肌动蛋白的聚合，这个过程我们将在此进行详细的讨论。

肌动蛋白单体聚合形成肌动蛋白纤维是一个多步骤的过程。该过程可以在体外进行研究，在低离子浓度的溶液中，该过程从纯化的肌动蛋白单体开始，当盐浓度增加到一定的生理水平时，聚合就开始了。在体外自主聚合所需的时间可以被分成三个不同的步骤：**成核**、**延伸**和**稳态**，如图 8.6 所示。

成核阶段形成了肌动蛋白寡聚体，它具有与长的纤维相似的性质。这种寡聚体被称作肌动蛋白聚合的核。该核是一个三聚体，它是具有横向和纵向接触的最小的纤维单位(如图 8.5)。因此，成核的发生分为两个步骤：由两个单体形成一个二聚体，随后第三个亚基加入，形成三聚体。肌动蛋白二聚体和三聚体是不稳定的（k_d 约为 100 μmol/L～1mmol/L)，并且浓度很低。因此，核的形成导致了一个停滞期，自主聚合发生在这

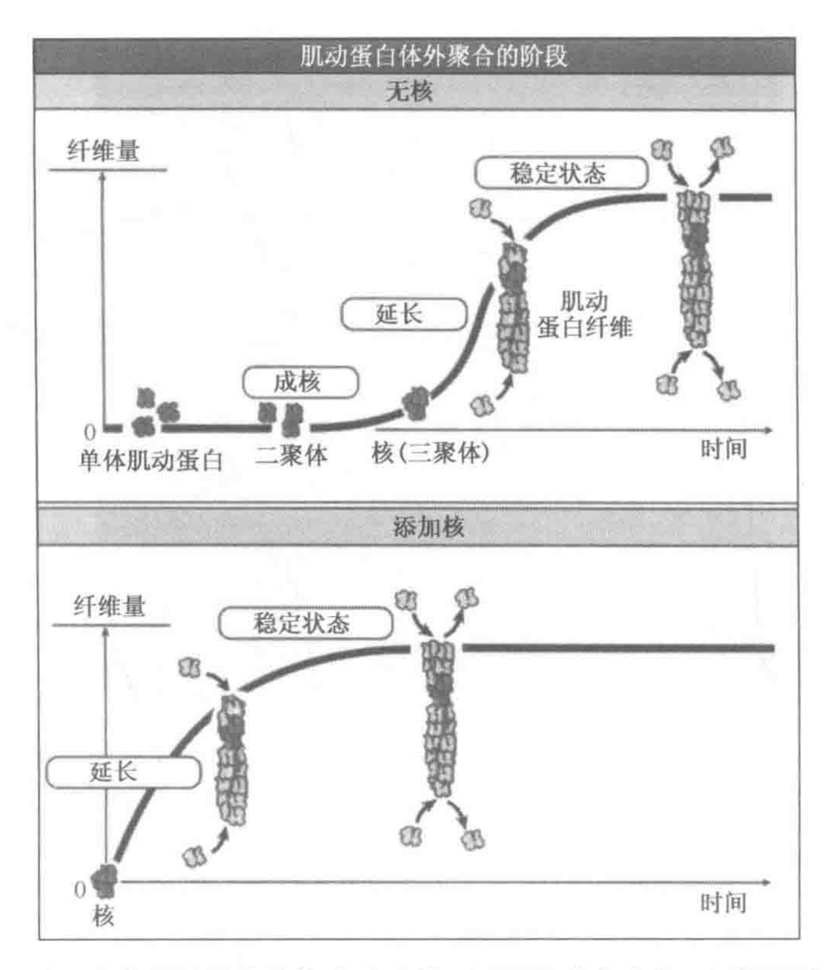


图 8.6　肌动蛋白装配过程从单体溶液开始，可以划分为成核、延伸和稳定期。成核阶段可以通过添加的少量前体纤维而被替代。

个时期内。单体可以在核上生长，而如果存在合适的核，那么这个停滞期就可消除（例如事先加入纤维)。在细胞内，则由肌动蛋白结合蛋白启动纤维的装配（见 8.9 成核蛋白控制细胞肌动蛋白的聚合)。

延伸期代表了纤维快速地、纵向地生长（如图 8.6)。肌动蛋白纤维的延伸生长发生在它们的末端而非两侧，因此，虽然纤维的长度多种多样，但是宽度都是一致的。随着亚基的聚合和溶液中自由单体含量的减少，延伸的速度逐渐减缓。

在聚合反应的稳定期，纤维的长度没有净增加。然而，单体库中的肌动蛋白亚基和纤维末端进行着缓慢而持续的互换。处于稳定期的未聚合的肌动蛋白单体的浓度即为**临界浓度（C_c)**，如图 8.7 所示。临界浓度也可以被定义为形成纤维所需要的肌动蛋白亚基的浓度（肌动蛋白聚合的 C_c)。当肌动蛋白单体的总浓度大于临界浓度的时候，纤维就会形成。相反，当肌动蛋白单体的总浓度低于临界浓度时，只会有单体存在。在一定的溶液环境下临界浓度是恒定的，但受到与肌动蛋白单体或纤维结合的调控因子的影响（见 8.8 肌动蛋白单体结合蛋白影响聚合 和 8.9 成核蛋白控制细胞肌动蛋白的聚合)。

当单体的浓度高于临界浓度时，纤维延伸率与溶液中单体的浓度呈线性关系，如图 8.8 所示。一根纤维的延伸速率是单体持续加入的速度（k_{on}；单位是 $\mu mol/L^{-1} sec^{-1}$)，并随着单体浓度的增加而增加。解聚速率（k_{off}）与单体肌动蛋白的浓度无关。当单体

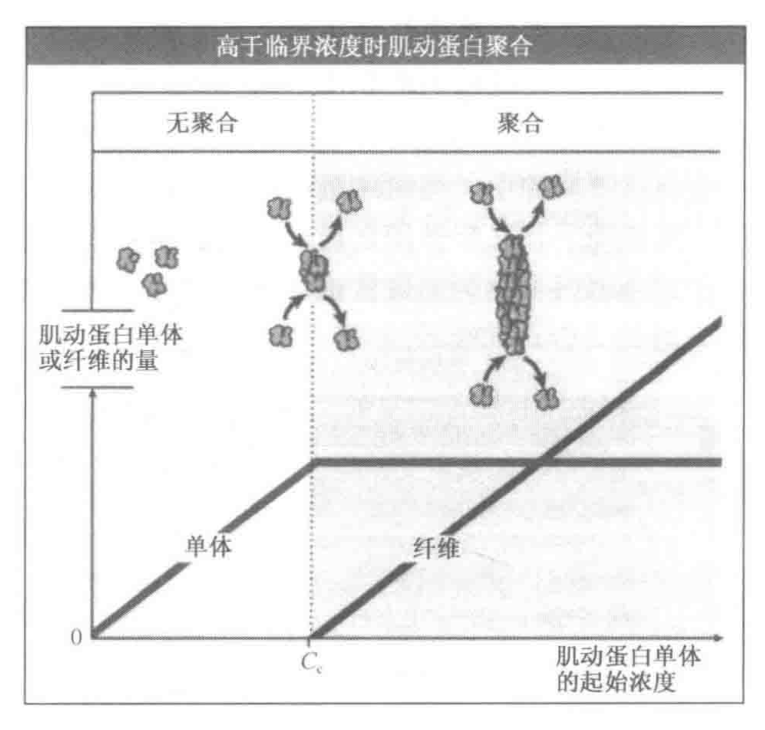


图 8.7　与体外测量的结果一致，肌动蛋白纤维的组装只在肌动蛋白单体的起始浓度超过临界浓度 C_c 时才会发生。

肌动蛋白浓度与临界浓度相等时，延伸率和解聚率相等，网络纤维不会增长：

$$(k_{on})(C_c) = (k_{off})$$

整理得到：

$$C_c = k_{off}/k_{on}$$

对于一个平衡反应，解离常数 $k_d = k_{off}/k_{on}$。因此，临界浓度等于肌动蛋白单体结合到纤维末端的解离平衡常数：

$$C_c = k_d$$

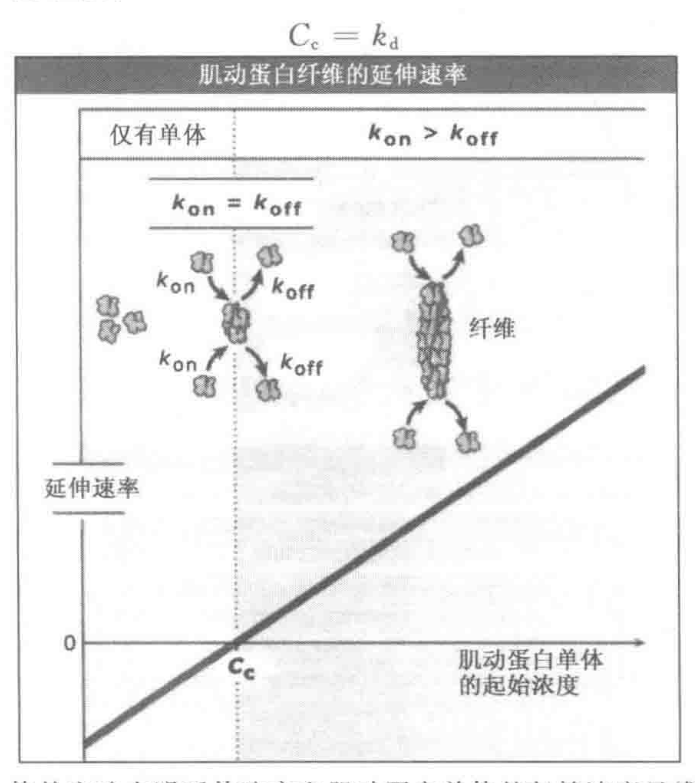


图 8.8　体外实验表明延伸速率和肌动蛋白单体的起始浓度呈线性相关。

单体加入到纤维两端的速度是不相等的。延伸速度常数 k_{off} 和解离速度常数 k_{on} 的值（及其比值和临界浓度）取决于与肌动蛋白结合的核苷酸（我们将在下一节中详细解释）。当有 ATP 存在时，肌动蛋白单体与纤维的倒刺端的结合率约比尖端快 10 倍，实验证据如图 8.9 所示。在这个实验中，与肌球蛋白结合的短肌动蛋白纤维被用于成核肌动蛋白的聚合。在电子显微镜下，在延伸期之后，观察到肌动蛋白的聚合更多地发生在倒刺端而非尖端。由于这个原因，倒刺端常常被定义为纤维的快速增长（正）末端，尖端被定义为纤维的慢速增长（负）末端。

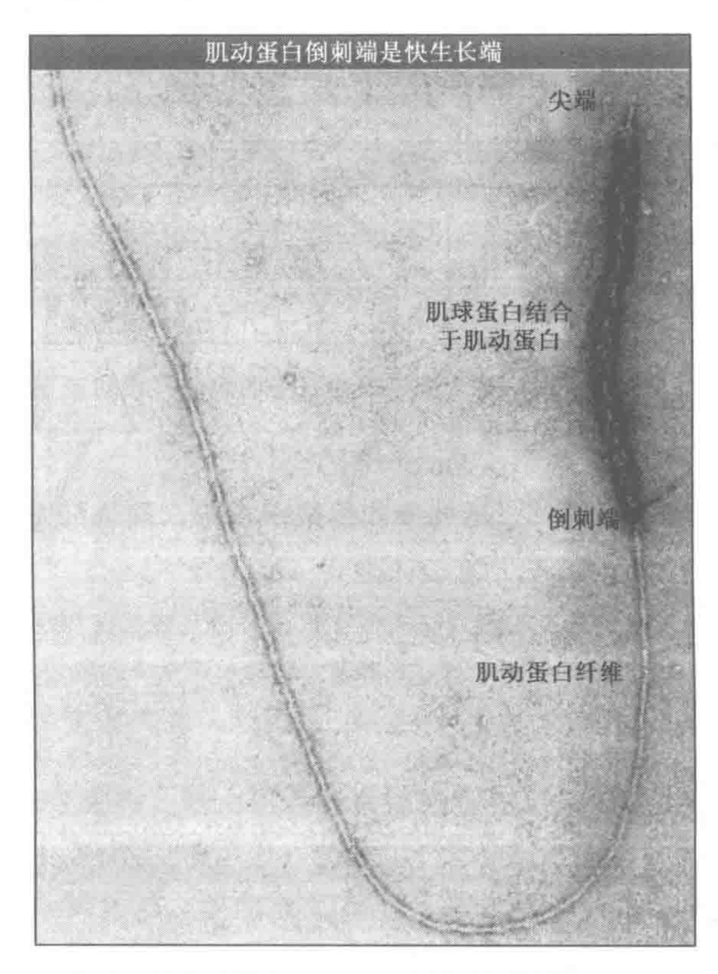


图 8.9　肌动蛋白的聚合最初是发生在纤维的倒刺端的实验电镜照片，肌球蛋白标记纤维作为纤维延伸的核。照片由 Johns Hopkins 医学院的 Marschall Runge 和 Yale 大学的 Thomas Pollard 惠赠。

8.6　肌动蛋白亚基聚合之后水解 ATP

关键概念

- 肌动蛋白纤维中的亚基对 ATP 的水解是完全不可逆的，这使得肌动蛋白的聚合成为一个非平衡过程。
- 肌动蛋白装配的临界浓度取决于肌动蛋白是与 ATP 还是与 ADP 结合。
- ATP 结合肌动蛋白的临界浓度比 ADP 结合肌动蛋白的临界浓度要低。
- 当 ATP 存在时，肌动蛋白纤维两端的临界浓度不同。

正如在上一节中讨论的那样，在体外肌动蛋白自发的装配可以由类似于质量作用和可逆反应动态的化学守则精确地描述。复合体的进一步伸长则由肌动蛋白亚基的酶活性所推动，其在掺入纤维后水解与其结合的 ATP。单体肌动蛋白不易水解 ATP，反之，在聚合时，它将 ATP 水解成 ADP 和无机磷（P_i）。ATP 被肌动蛋白水解是完全不可逆的。最初，ADP 和 P_i 与肌动蛋白是非共价地结合。磷慢慢地离开纤维，但是 ADP 保持紧密的结合并且只要肌动蛋白亚基不与纤维分离就不解离。

ATP 的水解对于聚合不是必需的。事实上，当肌动蛋白聚合时，如图 8.10 所示，在亚基掺入到纤维中和 ATP 的水解之间有一个滞后现象。并且，ATP 本身对于聚合也不是必要的：与 ADP 结合的单体可以自装配到纤维中。然而，ATP 的水解对于肌动蛋白在细胞中的调控和功能是非常重要的（见 8.8 肌动蛋白单体结合蛋白影响聚合和 8.9 成核蛋白控制细胞肌动蛋白的聚合）。

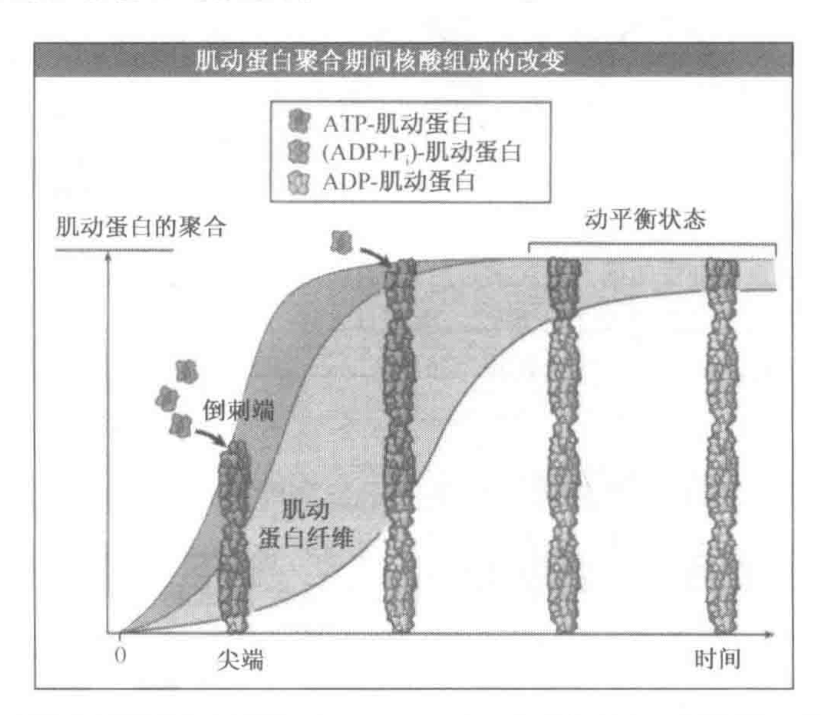


图 8.10 在纤维快速延伸的初始阶段，ATP-肌动蛋白单体结合于倒刺端，此时肌动蛋白亚基含有 ATP，或已经水解，则结合 ADP＋P_i。随着延伸的继续，自由单体库被消耗，延伸变得慢于 ATP 的水解。因此在稳定期，除了在倒刺端的肌动蛋白纤维含有 ADP＋P_i，肌动蛋白纤维主要由 ADP-肌动蛋白组成。引自 M. F. Carlier. *J. Biol. Chem.* 1991. 266：1-4。Copyright © 1991 美国生物化学协会和 Molecular Biology，Inc.。

如图 8.11 所示，肌动蛋白装配的临界浓度取决于结合的核苷酸的形式（ATP、ADP-P_i 或 ADP）。临界浓度的值由形成纤维所需的肌动蛋白单体的浓度以及由 k_{off} 和 k_{on} 计算所得到的值决定，后者由所处的体外体系所决定。在肌动蛋白纤维的倒刺端，ATP 结合肌动蛋白的临界浓度（约 0.1 μmol/L）低于 ADP 结合肌动蛋白（1.7 μmol/L）。这意味着提纯的 ATP 结合肌动蛋白单体持续地聚合成肌动蛋白纤维，直到单体的浓度降到约 0.1 μmol/L。同样，ADP 结合的肌动蛋白会一直聚合，直到单体的浓度到 1.9 μmol/L。由于 $C_c = k_d$，此值表明末端亚基的结合亲和力在 P_i 释放的同时发生变化。也就是说，来自于 ATP 水解的能量被储存在纤维中直到 P_i 被释放，此后末端亚基（此时是与 ADP 结合）与纤维的结合变得很弱。

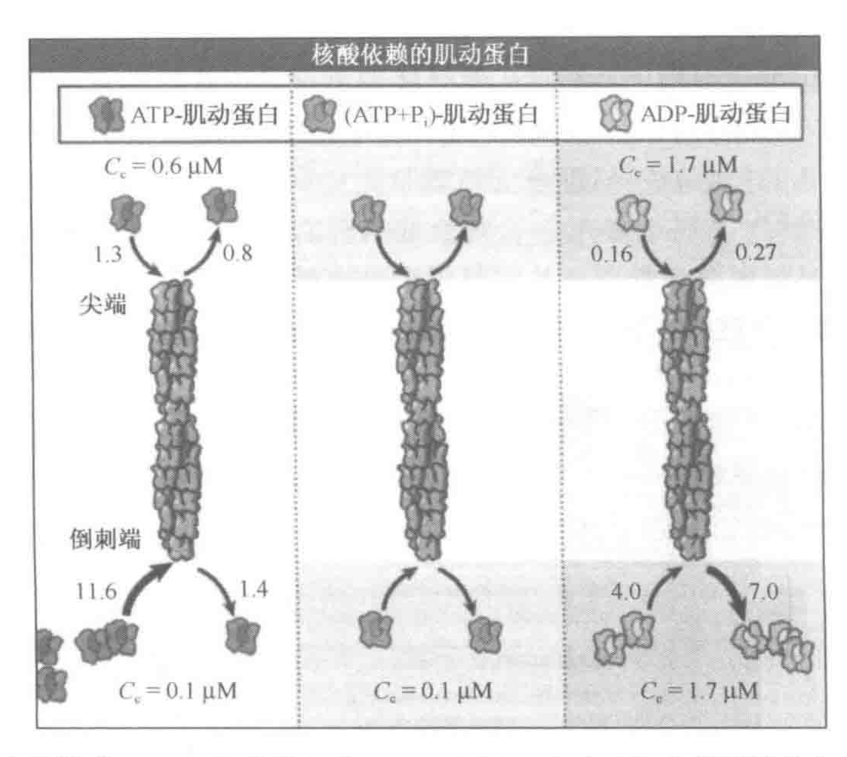


图 8.11 体外稳定环境中，ATP-肌动蛋白或（ADP＋P_i）-肌动蛋白在倒刺端的临界浓度（C_c）低于尖端，而 ADP-肌动蛋白在纤维的倒刺端和尖端的 C_c 值则相同。图中也给出了肌动蛋白单体的结合常数和解离常数，k_{on} 和 k_{off}，二者可用于计算 C_c。改编自 Yale 大学的 Enrique De La Cruz 惠赠的照片。经许可复制自 E. De La Cruz and T. D. Pollard. 2001. *Science*. 293：616-618. © AAAS。

对于由 ADP 结合肌动蛋白构成的肌动蛋白纤维，ADP 结合肌动蛋白单体的临界浓度（约 2 μmol/L）在两端大致相等，这是由于贯穿纤维以及在它们之间稳定联系的亚基是相同的。然而，当有 ATP 存在时，在倒刺端的临界浓度（0.1 μmol/L）低于尖端（0.7 μmol/L）。这是因为在倒刺端的肌动蛋白亚基含有 ATP（或者 ADP-P_i），而在尖端则是与 ADP 结合（见图 8.10）。这些纤维的化学极化是由于在倒刺端 ATP 结合单体的快速加入，这导致了一个“ATP 帽”的形成。在尖端，单体的加入是缓慢的，因此 ATP 的水解和磷的释放快于 ATP 结合肌动蛋白单体的加入（除非聚合是非常快速的）。

当肌动蛋白单体库由 ATP 结合肌动蛋白（在细胞中占统治地位）构成时，整个纤维的临界浓度（也就是稳定期肌动蛋白单体浓度）介于两端的临界浓度之间：高于倒刺端，低于尖端（见图 8.11）。因此，在稳定期，肌动蛋白单体（例如 ATP 结合肌动蛋白）与倒刺端结合，并在 ATP 水解之后释放 P_i，在尖端以 ADP 结合肌动蛋白的形式解聚。这种聚合以及解聚在整个纤维间产生了一个持续的亚基流，而没有改变整体的聚合体或者单体的浓度。这种流动被称为**“踏车现象”**，如图 8.12 所示。在细胞中，不受调控的踏车现象不会发生，而是由肌动蛋白结合蛋白控制。

在包含 ADP 的肌动蛋白单体装配成纤维的实验条件下，踏车现象不会发生，因为两端的临界浓度是相同的（如图 8.11）。因此，肌动蛋白亚基从尖端的解聚必须将结合的 ADP 换成 ATP 以便加入到倒刺端。来自于 ATP 水解的能量被使用，不是为了聚合本身，而是为了驱动肌动蛋白以及矢量循环单体的装配和解聚。

只有当肌动蛋白单体的浓度介于两端的临界浓度时，踏车现象才会发生。当单体的浓度高于倒刺端和尖端的临界浓度时，纤维在两端延伸。当单体浓度低于临界浓度时，

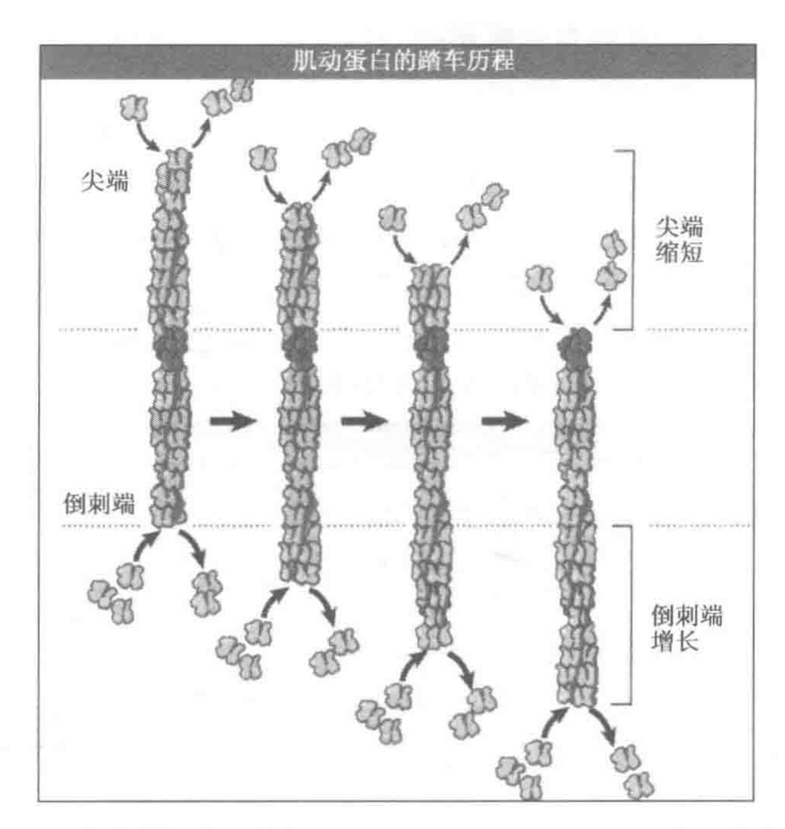


图 8.12　在稳定期，肌动蛋白纤维经历踏车现象，ATP 结合肌动蛋白单体快速地与倒刺端结合，ADP 结合肌动蛋白亚基以相似的速度从尖端解离，从而不改变纤维的长度。

纤维从两端解聚。当单体的浓度介于两端的临界浓度之间时，单体加入到倒刺端并从尖端离开。因此，我们可以看到，如果细胞控制肌动蛋白单体的浓度以及倒刺端和尖端的临界浓度，那么聚合和解聚的延伸、比率，以及定位就可以被调控。在下一节中我们将详细讨论。

肌动蛋白纤维与微管的聚合机制是相似的，它们都装配成极性结构，并且延伸也都伴随着核苷酸的水解。微管要经历动态的不稳定期，这是一个纤维快速聚合和解聚的过程。然而，肌动蛋白纤维并不经历这样一个纤维快速解聚的时期（称作塌缩期）。肌动蛋白纤维和微管的这个差异是由于肌动蛋白单体从纤维上解离的速度比微管慢约 100 倍的缘故（动态不稳定性的细节见 7.5 微管通过一种独特而有条件的动态不稳定过程进行组装和去组装。

8.7　肌动蛋白结合蛋白调控肌动蛋白的聚合和组装

关键概念

- 为了让微丝骨架驱动运动，细胞必须能够调控肌动蛋白的聚合和解聚。
- 肌动蛋白结合蛋白可与单体或纤维结合，并且调节细胞中肌动蛋白纤维的组装。

微丝骨架通过重组来对环境信号作出应答，从而刺激细胞进行分裂、分化或者运动。为了控制重组的过程，细胞必须能够快速地进行肌动蛋白纤维的装配和解聚。为了让微丝骨架能够驱动运动和改变细胞形状，必须存在调控机制：

- 抑制单体肌动蛋白库的自主聚合；
- 快速成核新的肌动蛋白纤维；
- 控制肌动蛋白纤维的长度；
- 以及延伸已经存在的肌动蛋白纤维。

许多受细胞内信号调控的肌动蛋白结合蛋白调节这些机制。细胞中肌动蛋白的聚合以及三维结构的组装受到大量肌动蛋白结合蛋白的调控，这些蛋白或是趋于结合肌动蛋白单体，或是趋于结合肌动蛋白纤维。调控蛋白中的某些类型在图 8.13 中列出。一些肌动蛋白的单体结合蛋白可以影响肌动蛋白与核苷酸的结合特性，帮助维持未聚合单体

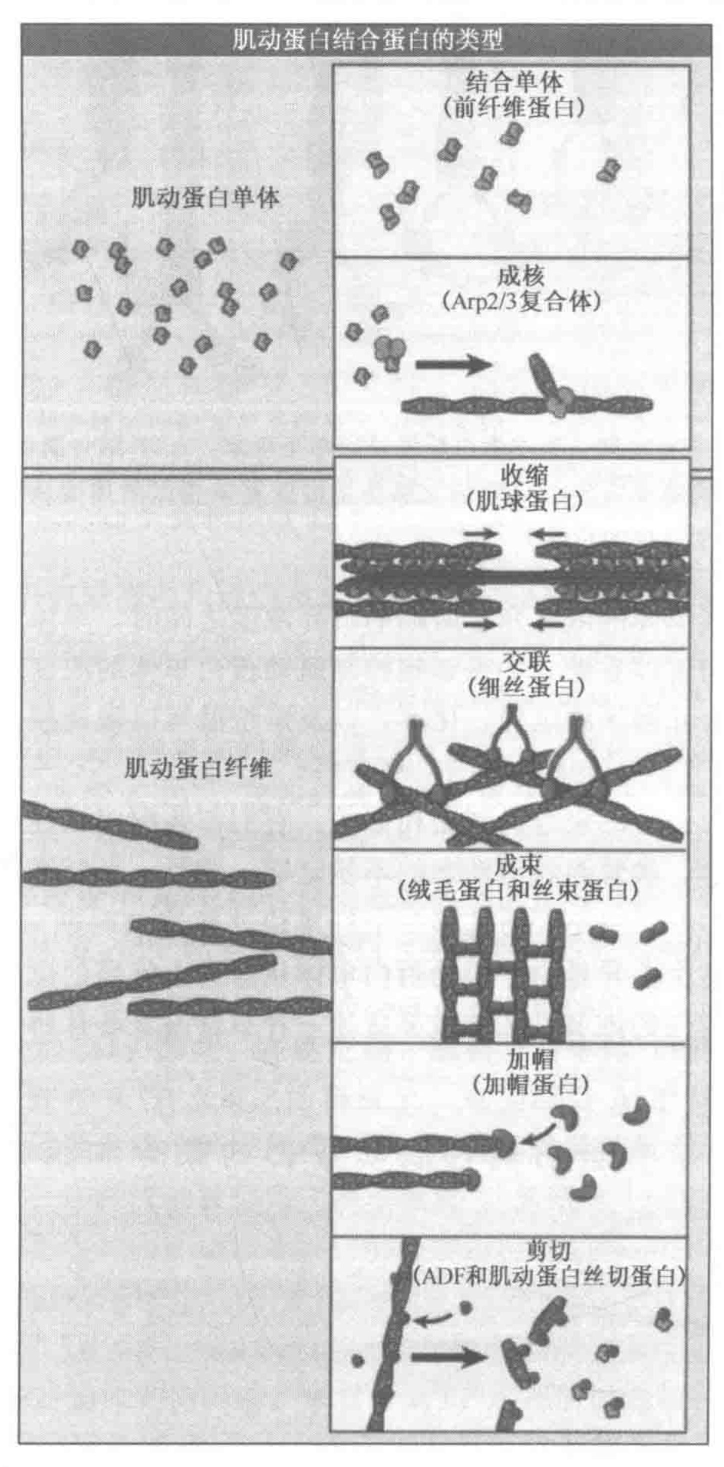


图 8.13　肌动蛋白结合蛋白调控细胞中肌动蛋白聚合的动态以及纤维的组装。其中一些与肌动蛋白单体相互作用发挥功能，其他的则与纤维相互作用。

库，并诱导方向一致的装配。与肌动蛋白纤维结合的蛋白能够稳定核和纤维、切断纤维、给纤维末端加帽，或者组装纤维形成束和网络。肌动蛋白结合蛋白的相互作用控制着肌动蛋白的功能，并引导肌动蛋白参与众多的胞内过程。在下一节中，我们将会讨论不同类型的肌动蛋白结合蛋白，接着再下一节总结这些蛋白共同作用的机制（见 8.13 肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白共同作用来驱动细胞迁移）。

8.8 肌动蛋白单体结合蛋白影响聚合

关键概念

- 许多真核细胞有两种主要的肌动蛋白单体结合蛋白——胸腺素 β_4 和前纤维蛋白（profilin）。
- 在后生动物细胞中，胸腺素 β_4 结合肌动蛋白单体，从而在细胞质中维持了一个可用于纤维快速延伸的 ATP 结合肌动蛋白库。
- 前纤维蛋白-肌动蛋白单体复合体参与倒刺端的延伸，但不参与尖端的延伸。

当细胞外信号启动了特定时间、位置的纤维伸长时，细胞维持肌动蛋白单体库，能够被用于快速的延伸。肌动蛋白纤维的延伸速度取决于可被用于聚合的肌动蛋白单体的浓度（如图 8.7）。为了在特定的细胞时间点产生快速的延伸，可被用于聚合的肌动蛋白单体的浓度必须远远高于临界浓度。与肌动蛋白单体结合的蛋白帮助调控纤维的生长速度。

在后生动物细胞中，胸腺素 β_4 和前纤维蛋白是两种最常见的**肌动蛋白单体结合蛋白**。胸腺素 β_4 只在高等真核生物中被发现，并在高度运动的细胞和吞噬细胞中的含量很高。前纤维蛋白在大部分真核细胞，包括植物、动物和酵母中都被发现了。这些蛋白的浓度可与细胞肌动蛋白总浓度相比。尽管它们都与肌动蛋白单体结合，胸腺素 β_4 和前纤维蛋白却对肌动蛋白聚合的调控有着不同的影响，但它们对生理过程都是十分重要的。

胸腺素 β_4 是一个短肽（<5kDa）。它是一个高度保守的肌动蛋白单体结合蛋白家族的成员，这个家族可以与单体肌动蛋白 1∶1 结合形成复合体。胸腺素 β_4 抑制肌动蛋白单体的自主聚合并阻止单体结合到已经存在的纤维上。尽管胸腺素 β_4 是一个短肽，但是它被认为可与肌动蛋白单体表面很大的一片区域结合，立体地封闭了许多重要的对于形成稳定纤维接触所必需的区域。在像中性粒细胞等高度运动细胞中，胸腺素 β_4 在细胞内的浓度可以达到几百微摩尔，使得细胞可以维持一个很大的细胞质肌动蛋白单体库。胸腺素 β_4 对 ATP 结合肌动蛋白单体（k_d 约 2 μmol/L）比 ADP 结合肌动蛋白单体（k_d 约 50 μmol/L）具有更高的结合亲和力，因此细胞中未聚合的肌动蛋白库主要是 ATP 结合的肌动蛋白。

前纤维蛋白也是一个能够与肌动蛋白单体 1∶1 地形成复合体的小分子质量肌动蛋白结合蛋白（约 15kDa）。然而，与胸腺素 β_4 不同的是，前纤维蛋白-肌动蛋白单体复合体可以与肌动蛋白纤维的倒刺端相结合。一旦前纤维蛋白-肌动蛋白复合体结合到倒刺端，前纤维蛋白就解离下来，并能够与另一个肌动蛋白单体结合。图 8.14 显示，由于前纤维蛋白与肌动蛋白单体的 1 和 3 亚结构域结合，它的出现封闭了单体与纤维尖端的结合。因此，前纤维蛋白-肌动蛋白专门地促进在纤维倒刺端的延伸。

前纤维蛋白另一个关键的性质是，它促进肌动蛋白单体上结合的核苷酸的互换。由于细胞内的 ATP 浓度远高于 ADP，因此前纤维蛋白使得肌动蛋白单体能够快速地与细胞质 ATP 达到平衡，并且使得 ADP 结合肌动蛋白单体变成 ATP 结合肌动蛋白单体，帮助维持纤维快速生长所需的 ATP 结合肌动蛋白单体库（胸腺素 β_4 和前纤维蛋白在细胞肌动蛋白重组过程中的作用的细节见 8.13 肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白共同作用来驱动细胞迁移）。

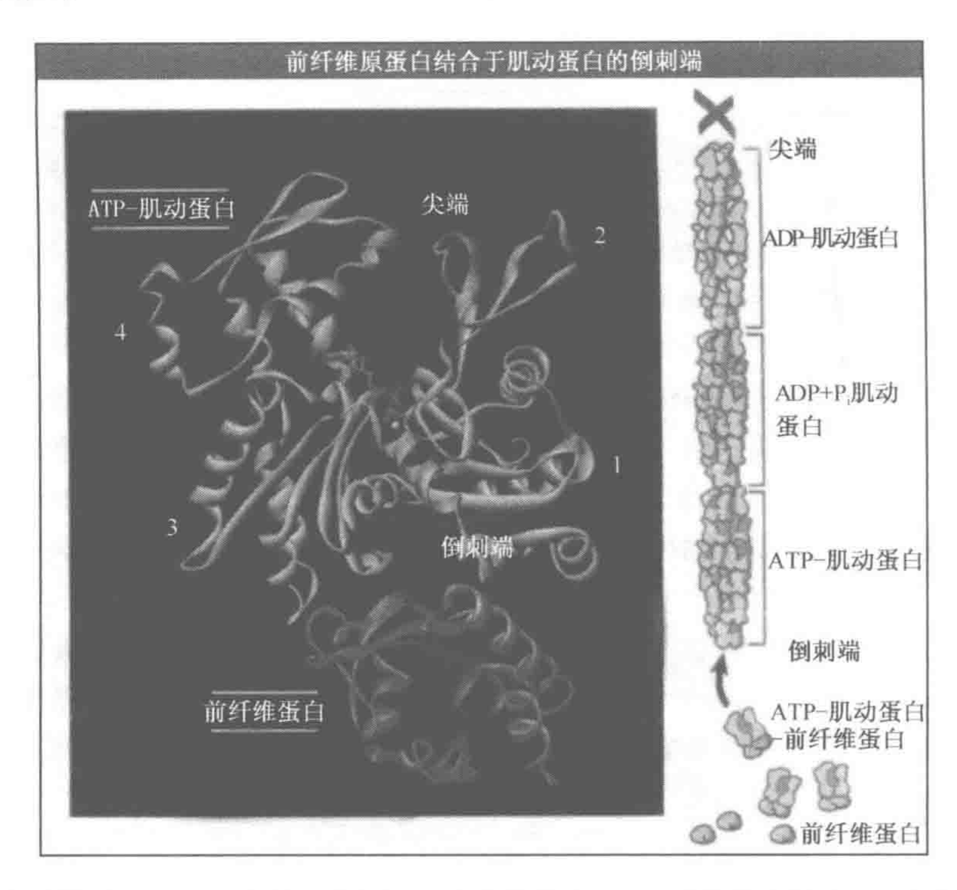


图 8.14 抑制蛋白与肌动蛋白单体的倒刺端结合并通过只允许单体掺入到倒刺端来帮助调控肌动蛋白的聚合。抑制蛋白-肌动蛋白复合体的原子结构图来自 Protein Data Bank file 2BTF。

8.9 成核蛋白控制细胞肌动蛋白的聚合

关键概念

- 成核蛋白使细胞得以控制体内新生纤维的形成时间和地点。
- Arp2/3 复合体和 formin 起始体内的成核。
- Arp2/3 起始的核为有分支的纤维网络，而 formin 蛋白起始的核则不分支。
- Arp2/3 在细胞膜上被 Scar、WASP 和 WAVE 蛋白活化。

在体外新的肌动蛋白纤维的聚合中，成核是最慢的步骤（如图 8.6），这是调控肌动蛋白聚合的一个重要的控制点。为了使新的肌动蛋白纤维以立体调控的方式快速聚合，成核的步骤需要被加速。促进新生纤维形成的蛋白质被称作成**核蛋白**。Arp2/3 复合体和 formin 是两种类型的肌动蛋白纤维成核因子，它们在调控细胞运动中起着非常重要的作用，并且各具特征。这些蛋白质通过不同的成核机制在细胞中产生不同类型的纤维网络。

Arp2/3 是一个包含 Arp2、Arp3 和 5 个其他蛋白质的大蛋白复合体，它的 X 射线晶体结构见图 8.15。Arp2 和 Arp3 是肌动蛋白结合蛋白。尽管 Arp2 和 Arp3 在结构上与肌动蛋白（如图 8.2）相似，但是它们缺少聚合形成纤维的能力。Arp2 和 Arp3 结合到复合体中的方式与稳定的倒刺端的肌动蛋白二聚体的裸露部分相似，从而提供了一个稳定的结合位点使得肌动蛋白单体得以在瞬间结合上去。由于新的纤维是在倒刺端延伸，Arp2/3 复合体位于尖端。

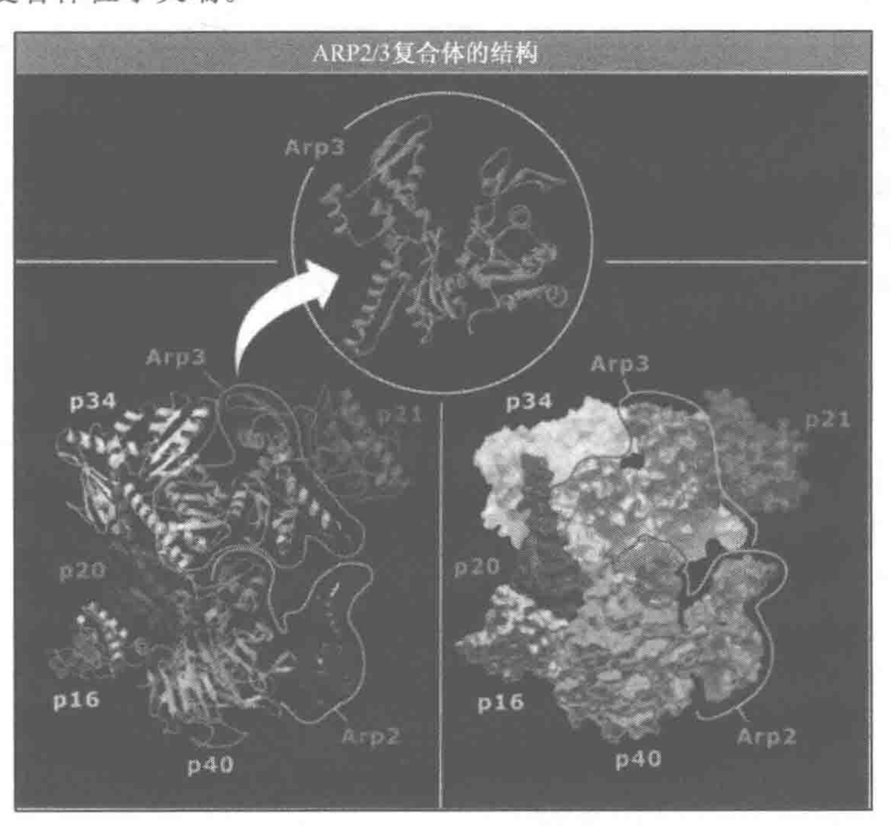


图 8.15　Arp2/3 蛋白复合体的 X 射线晶体结构，蛋白主链的每一个亚基都由带状图（左图），或者空间填充模型（右图）来表示。Arp2 和 Arp3 在结构上与肌动蛋白相似。Arp3 的图像由 Protein Date Bank file 1KBK 生成。Arp2/3 复合体的结构图由 Yale 大学的 Thomas D. Pollard 惠赠。经许可复制自 Robinson，R. C.，et al. 2001. *Science*. 294：1679-1684。© 2001 AAAS。

Arp2/3 复合体与调控蛋白和已经存在的肌动蛋白纤维的相互作用激活其成核活性。由 Arp2/3 复合体起始的成核过程可以发生在质膜上（如图 8.22）。新成核的“子”纤维可以在“母”纤维的倒刺端，并与纤维侧面呈 70°的方向生长。体外实验显示，Arp2/3 复合体的这种侧面结合成核活性可以产生树枝状的肌动蛋白网络结构，这与在运动细胞中快速生长的边缘的现象十分相似（见图 8.1 中的薄片状伪足）。Arp2/3 复合体与纤维中结合有 ATP 或者 ADP-P_i 的亚基（“年轻”纤维）的结合能力远远大于含有 ADP 的亚基（“年老”纤维）（见 8.6 肌动蛋白亚基聚合之后水解 ATP）。Arp2/3 优先结合并从新生纤维处产生分支。随着 P_i 的释放和纤维的成熟，Arp2/3 从肌动蛋白纤维上解离，导致分支的脱落，进而肌动蛋白纤维网络散解。

许多蛋白质在膜上激活 Arp2/3 复合体以对信号转导通路进行应答。Arp2/3 在膜上的活化对于在膜突出部位肌动蛋白的作用是十分重要的（见 8.13 肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白共同作用来驱动细胞迁移）这些蛋白质由包括 Scar（cAMP 受体的抑制因

子)、WASP（Wiskott-aldrich 综合症蛋白）和 WAVE（WASP-verprolin 同源物）在内的小 G 蛋白激活。这些蛋白质与已存在的肌动蛋白纤维一起行使功能，激活 Arp2/3 复合体。

Formin 是一个结构保守的蛋白家族，它是以小鼠的基因 *limbdeformity* 来命名的。Formin 家族的成员含有两个被称作 formin 同源结构-1 和-2（FH1 和 FH2）的特殊的同源结构域。FH1 结构域与前纤维蛋白接合，FH2 结构域启动肌动蛋白的成核聚合。Formin 很明显地在倒刺端延伸的过程中保持与纤维倒刺端的结合，保护倒刺端在延伸过程中不受加帽蛋白的影响，并通过直接与前纤维蛋白接合提高延伸速度。

这种通过 formin 的成核和延伸的机制不同于 Arp2/3 复合体，后者在延伸过程中保持与纤维尖端的结合。如图 8.16 所示，由于 formin 诱导产生新的肌动蛋白纤维，而不是与已存在的纤维的侧面结合，所以它们调控不分支纤维的组装，而非由 Arp2/3 复合体所产生的分支网络结构。

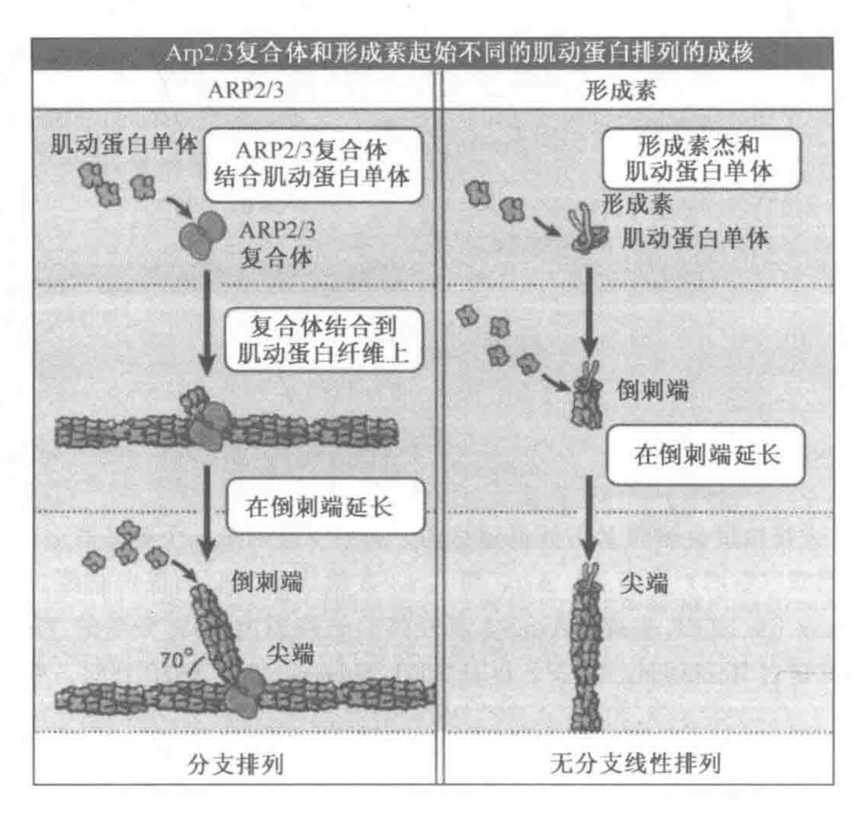


图 8.16 Arp2/3 复合体成核形成分支肌动蛋白结构，而 formin 成核形成不分支的、线性的肌动蛋白结构。

8.10 加帽蛋白调控肌动蛋白纤维的长度

关键概念

- 加帽蛋白抑制肌动蛋白的延伸。
- 加帽蛋白在肌动蛋白纤维的倒刺端或尖端发挥功能。
- 加帽蛋白和凝溶胶蛋白在倒刺端抑制延伸，并被质膜上的磷脂所抑制。
- 原肌球调节蛋白是一个将肌动蛋白纤维尖端加帽的蛋白质。

在体外，不受调控的肌动蛋白纤维持续地迅速生长，直到自由单体的浓度达到临界浓度（见图 8.6 和图 8.7）。在体内，存在控制自由倒刺端数量的细胞机制。这种调控对于阻止肌动蛋白单体库的枯竭和调控特定的肌动蛋白结构的规模是必要的。另外，由于短肌动蛋白纤维较长纤维坚硬，因此对纤维长度的调控会影响肌动蛋白网络结构的刚性。与肌动蛋白纤维末端结合并且阻止肌动蛋白单体掺入的蛋白质称作**加帽蛋白**。某些加帽蛋白与倒刺端结合，而其他的与尖端结合。倒刺端加帽蛋白通过阻止延伸来限制肌动蛋白纤维的长度，尖端加帽蛋白则阻止解聚。

倒刺端加帽蛋白包括加帽蛋白（也被称作 CapZ）EPS8 和凝溶胶蛋白超级家族的成员。尽管它们的结构以及作用机制是不同的，但是加帽蛋白和凝溶胶蛋白都与肌动蛋白纤维的倒刺端结合并通过阻止单体的加入来抑制延伸。这些蛋白质对肌动蛋白纤维的倒刺端具有很高的亲和力，即使是在肌动蛋白单体具有很高的细胞浓度的情况下，也能抑制肌动蛋白亚基的加入（CapZ 的细节见 8.21 肌球蛋白-II 在肌肉收缩中的功能）。

凝溶胶蛋白和加帽蛋白的加帽作用都受到质膜上磷脂的调控。脂类 4，5-二磷酸磷脂酰肌醇（PIP_2）将两种类型的加帽蛋白从肌动蛋白纤维的倒刺端解离下来，从而为在质膜上的去帽化或抑制加帽提供了一种机制。PIP_2 定位在质膜的内侧并对细胞内信号十分重要。某些 G 蛋白偶联的细胞表面受体响应某些信号，进而调节 PIP_2 的水平。考虑到对在细胞膜上纤维延伸的控制，调控去帽化对于细胞迁移和膜突起来说是非常重要的（见 8.13 肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白共同作用来驱动细胞迁移）。加帽蛋白活性水平可能会影响由细胞形成的突起的类型（层形足板或丝足）（PIP_2 的细节见第 14 章细胞信号转导原理）。

蛋白质的原肌球调节蛋白家族大多都具有加帽蛋白的特性，这些加帽蛋白在肌动蛋白调节蛋白原肌球蛋白存在的情况下，与肌动蛋白纤维的尖端高亲和性地结合。原肌球调节蛋白帮助决定横纹肌中肌动蛋白纤维的长度（见 8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能）。原肌球调节蛋白也调控红细胞和上皮细胞中肌动蛋白纤维的长度和组装动态。

8.11 剪切及解聚蛋白调控肌动蛋白纤维的动态

关键概念

- 肌动蛋白纤维必须是可解聚的，从而维持一个可溶的单体库。
- Cofilin/ADF 蛋白家族的单体剪切并催化肌动蛋白纤维的解聚。
- 剪切增加了可用于装配和解聚的纤维末端的数量。
- Cofilin/ADF 协作结合并改变肌动蛋白纤维的捻度。
- 结合有 ADF 的肌动蛋白纤维是 cofilin/ADF 蛋白的靶目标。

细胞为了快速补充肌动蛋白单体可溶库，聚合的肌动蛋白纤维必须是可解聚的。尽管新合成的蛋白对于维持肌动蛋白单体库也是必需的，但是它的发生对于肌动蛋白细胞骨架的快速重组来说太过缓慢。肌动蛋白调控蛋白的 cofilin/肌动蛋白聚合因子（ADF）家族的单体与肌动蛋白纤维结合，并通过两种方式来加速它们的分解：通过增加亚基从纤维末端的解聚速度以及通过片段化（剪切）纤维。后者也会增加可用于延伸的纤维末

端的数量。Cofilin/ADF 蛋白与肌动蛋白纤维的结合是协同的，因此即使在低浓度时，这些蛋白质对于靶纤维的解聚也是非常有效的。

如图 8.17 所示，对自然状态以及由 cofilin 修饰的肌动蛋白纤维的电子显微镜观察发现 cofilin 能够增加纤维的平均螺旋捻度。螺旋捻度的改变可能促进 cofilin 的协同结合，这种协同结合改变物理张力，并帮助分离亚基以及通过瓦解稳定的纵向的和横向的肌动蛋白亚基间的接触来剪切纤维。

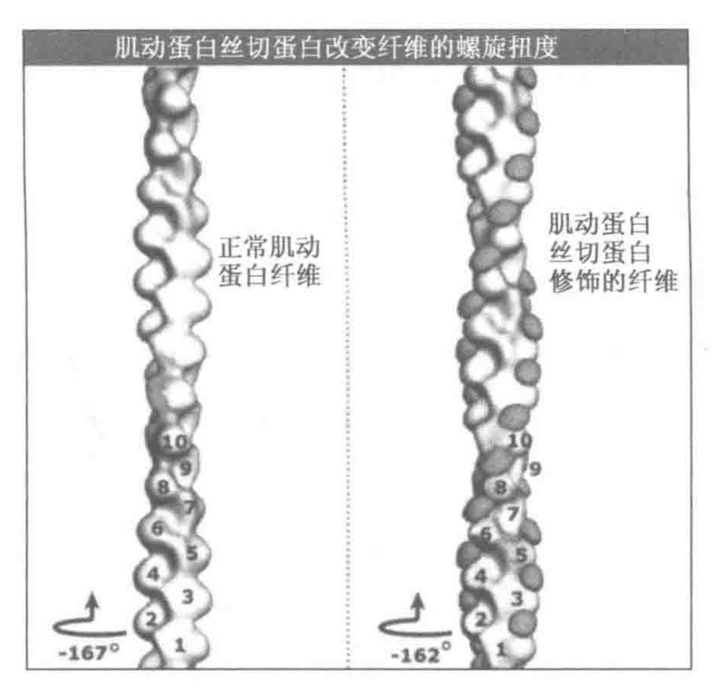


图 8.17　多种 cofilin 分子与肌动蛋白纤维的结合增加了螺旋捻度，这可能使亚基的相互作用不稳定并破坏纤维。照片复制自 *Trends. Cell Bio.*，vol. 364，Bamburg，J. R.，McGough，A.，and Ono，S. Putting a new twist on actin……pp. 364-370。Copyright 1999，获得 Elsevier 许可。照片由科罗拉多州立大学的 James Bamburg 惠赠。

Cofilin/ADF 与肌动蛋白纤维的结合高度依赖于与肌动蛋白亚基结合的核酸。与 ADP 结合的纤维被 cofilin/ADF 蛋白选择性地识别并剪切。Cofilin/ADF 与结合有 ADP-P_i 的纤维的亲和力很弱，因此这些纤维可以抵抗剪切。与 ADP-肌动蛋白的优先结合确保了 cofilin/ADF 蛋白不会解聚含有 ATP-或 ADP-P_i-肌动蛋白的新合成的纤维，而是把 ADP-肌动蛋白亚基作为靶点。因此，在一个细胞对环境信号进行应答的过程中，由于微丝骨架的重组，较老的纤维优先地被解聚。

8.12　交联蛋白组装肌动蛋白纤维束和正交网络

关键概念

- 交联蛋白连接肌动蛋白纤维形成束和正交网络。
- 肌动蛋白束和网络的机械性十分坚固。
- 肌动蛋白交联蛋白有两个与肌动蛋白纤维的结合位点。
- 肌动蛋白束帮助形成层形足板和丝足。
- 正交肌动蛋白网络形成片层（lamellae）和凝胶。

由于肌动蛋白纤维要保证细胞具有一定的形状和强度，它们必须组织成复杂的更高级的结构或排列。在细胞中发现的两个主要的结构类型是**肌动蛋白束**和**肌动蛋白网络**。成束的肌动蛋白平行排列，而网络中的纤维十字交叉并组织成正交的、网状的网络组织（见图 8.1 中的片状伪足）。这两种结构都为细胞提供机械支持，并能够推动向生长方向的迁移。肌动蛋白阵列可以横跨细胞质中相对较大的区域。

通过肌动蛋白纤维与**交联蛋白**的相互作用形成束和网。不同类型的细胞表达不同的交联蛋白。交联蛋白一次与两个肌动蛋白纤维相互作用，因此必须具有两个肌动蛋白纤维的结合位点，如图 8.18 所示。在许多例子中，肌动蛋白的结合和网络的形成被某些交联蛋白的磷酸化所抑制。

肌动蛋白交联蛋白			
组	蛋白质	分子质量/kDa	定位
Ⅰ	fascin	55	• 顶体过程 • 丝足 • 层形足板 • 微绒毛 • 张力丝
	Scruin	102	• 顶体过程
Ⅱ	绒毛蛋白	92	• 肠内以及肾刷边界微绒毛
Ⅲ Calponin 同源结构域 超家族	丝束蛋白	68	• 黏性小半鞘翅 • 微绒毛 • 静纤毛 • 酵母肌动蛋白链
	抗肌萎缩蛋白	427	• 肌肉皮质网络
	ABP120	92	• 伪足
	α-辅肌动蛋白	102	• 黏性小半鞘翅 • 丝足 • 层形足板 • 张力丝
	细丝蛋白	280	• 丝足 • 伪足
	血影蛋白	α 280 β 246-257	• 皮质网络

图 8.18　组织肌动蛋白形成阵列的交联蛋白具有肌动蛋白结合结构域的分子结构，它们被不同长度的间隔区分离开。根据它们的肌动蛋白结合结构域（ABD）的性质，这些蛋白质可以被分成三组。Ⅰ组蛋白具有独特的 ABD，而Ⅱ组蛋白绒毛蛋白有一个大约 7kDa 的 ABD。Ⅲ组蛋白有 calponin（注：一种钙结合蛋白）同源结构域（每个大约 26kDa），这种同源结构域是一种存在于许多不同的肌动蛋白结合蛋白中的肌动蛋白结合结构域。

图 8.18 所示为肌动蛋白纤维的交联蛋白，这些蛋白质能够被分成三类。某些肌动蛋白纤维交联蛋白是肌动蛋白结合结构域（ABD）家族的成员。它们是Ⅲ组蛋白，包括丝束蛋白、α-辅肌动蛋白、血影蛋白、以及 ABP120。其中 ABP120 有一个保守的 27 kDa ABD，由两个 α-螺旋的钙调蛋白（calponin）的同源结构域组成。大部分 ABD 家族蛋白形成同源或异源二聚体，从而使每个分子具有两个 ABD，从而能够结合、交联两个不同的纤维。如图 8.19 所示，肌动蛋白排列的类型取决于几何组装以及结构域的间距。例如，一个丝束蛋白单体的两个 ABD 相互靠近，这使得丝束蛋白形成像微绒毛中一样的紧密连接的肌动蛋白束。相反，α-辅肌动蛋白、血影蛋白，以及抗肌萎缩蛋白二聚体的 ABD 由较长的间隔区域分开，因此这些蛋白形成疏松的肌动蛋白束和网络。

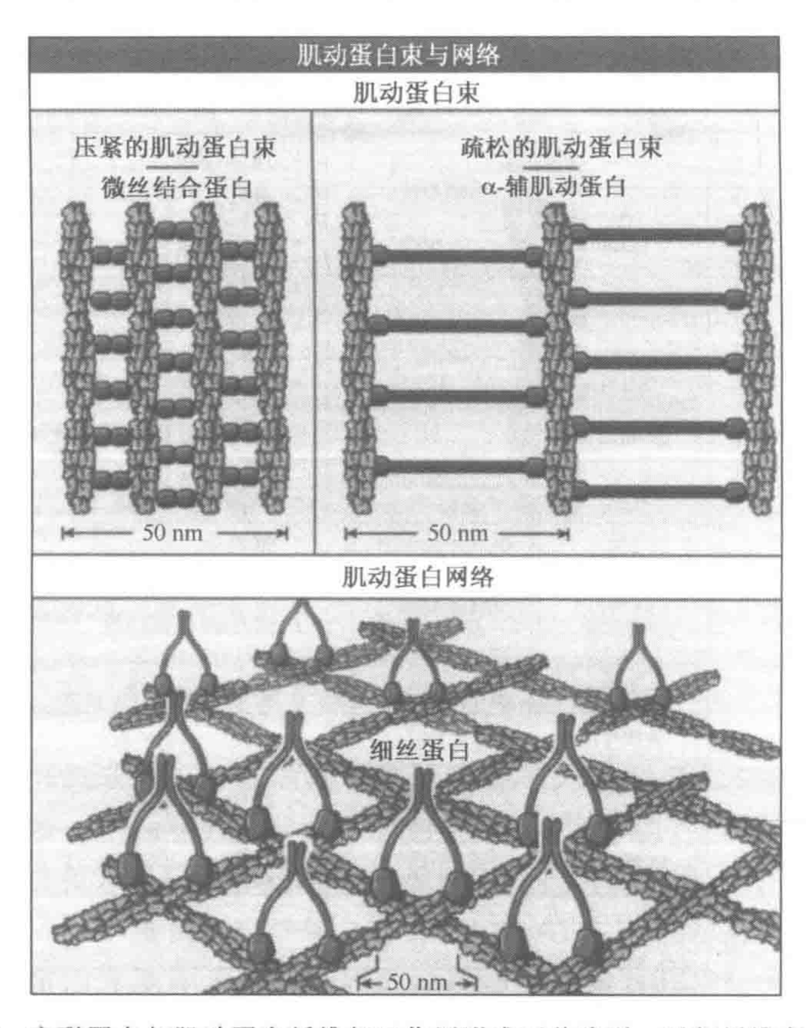


图 8.19　交联蛋白与肌动蛋白纤维相互作用形成两种阵列：平行纤维束和网络。

肌动蛋白纤维交联蛋白是与 ABD 家族不同的蛋白，包括 fascin 和绒毛蛋白，它们分别属于Ⅰ组和Ⅱ组（如图 8.18）。如图 8.20 所示，fanscin 组织纤维形成紧密包装的束；这些束塑造丝足，就像在迁移神经元的生长锥中发现的那样（见图 8.1）。绒毛蛋白在某些类型上皮细胞的微绒毛中富集（见图 8.1）。在绒毛蛋白中，像在丝束蛋白中一样，与肌动蛋白结合的结构域紧密靠近，并且在微绒毛中这两个蛋白都与肌动蛋白纤维交联。

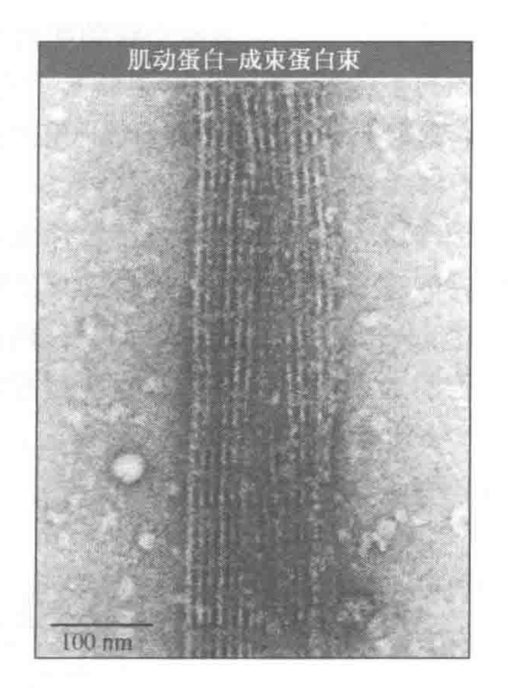


图 8.20 一束被 fascin 交联的肌动蛋白纤维的透射电子显微照片。复制自 *The Journal of Cell Biology*，1994，vol. 125，pp. 369-380，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。照片由 Yale 大学医学院的 Lynn Cooley 惠赠。

8.13 肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白共同作用来驱动细胞迁移

关键概念

- **肌动蛋白以及和肌动蛋白单体和纤维的结合蛋白之间的相互作用调节细胞的突出结构的生长和组装。**
- **肌动蛋白单体与位于细胞质膜上的肌动蛋白纤维的倒刺端的结合推动膜向外突出**

细胞沿着表面的蠕动需要富含肌动蛋白的突出结构的形成和伸长、突出黏附到表面（见第 15 章细胞外基质和细胞粘连），以及细胞体的相互作用。在本节中，如图 8.21 所示，我们将会讨论肌动蛋白的调节聚合是如何驱动迁移细胞的片状伪足向前突出的，而肌动蛋白的聚合则是肌动蛋白细胞骨架重组的结果。片状伪足形成和延伸的机制已有很好的阐述。片状伪足的形成需要由 Arp2/3 复合体起始肌动蛋白成核。随

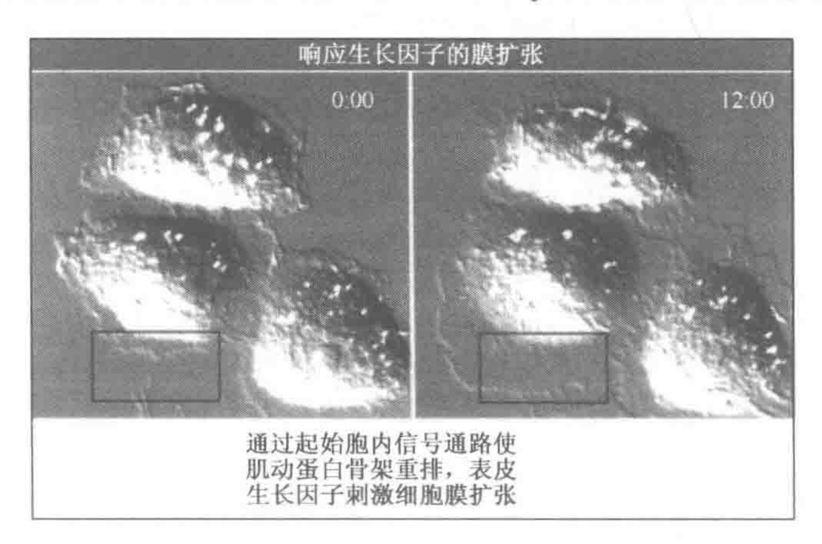


图 8.21 表皮生长因子（EGF）刺激表达 EGF 受体的细胞的迁移和分裂。这些视频截图显示上皮细胞通过由肌动蛋白聚合产生的膜延伸来对 EGF 进行应答。照片由 Pennsylvania 大学的 E. Michael Ostap 惠赠。

后的肌动蛋白单体向定位在细胞边缘的肌动蛋白纤维的倒刺端的掺入有效地向外推动质膜（这些是如何发生的细节见 8.24 补充：聚合物的装配是如何产生力的两个模型）。令人注目的是，这样的运动可在体外由纯化的肌动蛋白、活化的 Arp23、cofilin 和加帽蛋白重现。

在许多细胞中，随着细胞的迁移，片状伪足维持一个相对恒定的尺寸，这是因为在前沿的单体掺入速度与片状伪足尾部的纤维解聚速率相等。肌动蛋白、成核因子、加帽蛋白、隔离蛋白和剪切蛋白之间的相互作用调控生长并且决定突出的几何形状。

这一系列引起肌动蛋白骨架重组的过程始于细胞外的起始信号，这些信号转导途径活化 WASP/Scar 蛋白，如图 8.22 所示。这些蛋白结合、活化 Arp2/3 复合体，复合体再诱导成核，使母纤维产生新的分支纤维。活化的几何位置确定了新的纤维的倒刺端是朝向质膜的。

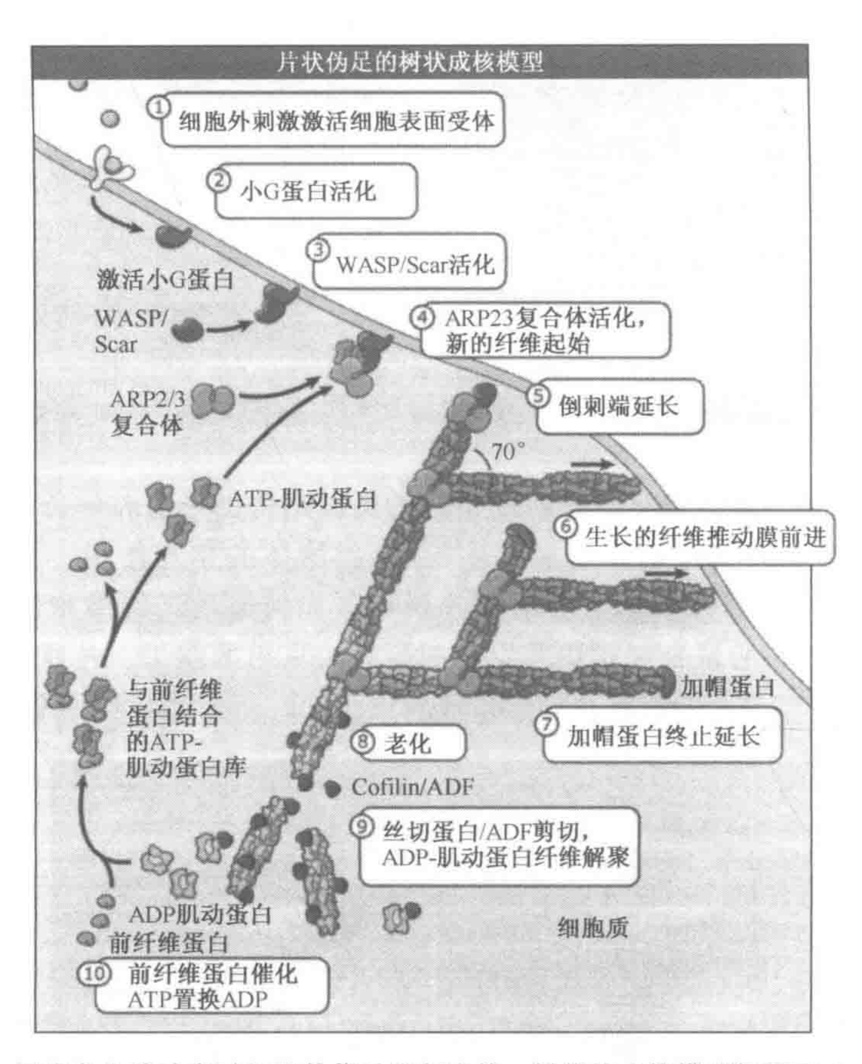


图 8.22　细胞发生移动来对细胞外信号进行应答。树状的成核模型解释了 Arp2/3 是怎样成核形成分支的肌动蛋白纤维网络的装配，以及纤维的聚合是怎样驱动细胞前沿向前运动的。经许可改编自 Yale 大学的 Thomas D. Pollard 惠赠的照片，引自 *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*，Volume 29。© 2000 Annual Reviews（www.annualreviews.org）。

纤维快速地延伸并向前推动膜直到倒刺端被加帽蛋白加帽。Arp2/3 复合体和新聚合的、短的、加帽的肌动蛋白纤维形成一个形态学的网状组织，该网络机械性地适合膜

在一个表面上持久地突出生长（见图 8.1 中的片状伪足）。

胸腺素 β_4 结合的 ATP 肌动蛋白的可溶性库供应用于延伸的单体。ATP 肌动蛋白单体在胸腺素 β_4 和前纤维蛋白之间维持平衡。在前纤维蛋白-肌动蛋白复合体中，肌动蛋白与肌动蛋白纤维自由的倒刺端结合，一旦前纤维蛋白-肌动蛋白复合体结合到倒刺端，前纤维蛋白分离，从而使得另一个单体可以加入到纤维上。与聚合的肌动蛋白亚基结合的 ATP 被水解，并且磷酸根被缓慢释放，结果形成 ADP 肌动蛋白。磷的释放增加了 Arp2/3 复合体从肌动蛋白纤维上的解离速率；它也使得 cofilin/ADF 能够与 ADP 肌动蛋白结合，进而剪切、解聚肌动蛋白纤维。然后前纤维蛋白催化从纤维上释放出的肌动蛋白单体上的 ADP 被 ATP 替换。

8.14 小 G 蛋白调控肌动蛋白聚合

关键概念

- 小 G 蛋白 Rho 家族的单体调控肌动蛋白的聚合和动态。
- Rho、Rac 和 Cdc42 蛋白的活化分别诱导片状伪足、丝足和收缩性纤维的形成。

正如在前一节中所讨论的那样，导致肌动蛋白细胞骨架重组的一系列事件开始于起始信号转导途径的细胞外信号，这些信号转导途径依次激活 WASP/Scar 蛋白。许多促进细胞迁移以及改变细胞形状的细胞外因子，例如生长因子、化学引诱物和化学排斥物与跨膜受体结合。信号通过这些受体激活单体 G 蛋白的 Rho 家族成员，不同的细胞表面受体激活不同的 Rho 家族蛋白。Rho 蛋白是 GTPase，并且是 Ras 超家族的成员，被上游的 GTP 替换 GDP 所激活（见 14.23 小的单体 GTP 结合蛋白是多用开关）。在人类细胞中已经发现了至少 20 种不同的编码 Rho 家族蛋白的基因。根据氨基酸序列和细胞的功能，这些蛋白可以被分成 Rho、Rac 和 Cdc42 亚家族。其中的一些在协调肌动蛋白细胞骨架的协同变化以应答细胞外信号中起着重要的作用。

Rac 和 Cdc42 亚家族的蛋白通过激活 WASP/Scar 和 WAVW 蛋白促进肌动蛋白的重组，这些蛋白是 Arp2/3 复合体的激活因子。图 8.23 显示 Rac、Cdc42 和 Rho 活化的结果，每一个都有不同的下游靶点，并因此诱导不同的肌动蛋白结构的形成。Rac 样蛋白诱导片状伪足和膜褶皱的形成，膜褶皱是伸长和收缩背向细胞表面的片状伪足样结构。Rac 样蛋白不与 WAVE 蛋白直接作用，而是将 WAVE 蛋白从失去活性的复合体中释放以使它们可以与 Arp2/3 复合体相互作用。Cdc42 样蛋白与 WASP 直接结合，这种结合将 WASP 从一种非活性形式变成一种可以刺激 Arp2/3 复合体的活性形式。Cdc42 的激活调解肌动蛋白纤维束和丝足伸长的形成。

Rho 家族蛋白刺激含有肌动蛋白和肌球蛋白Ⅱ的收缩性纤维（例如图 8.1 中的张力丝）的形成。这些收缩性纤维被认为在细胞中维持机械张力并对细胞形状和附着所需的力有贡献（张力丝和黏着斑的细节见 15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导）。Rho 蛋白产生的信号导致肌球蛋白轻链的磷酸化，这激活了非肌细胞肌球蛋白（见 8.20 肌球蛋白受多重机制调控）。Rho 蛋白也可以通过激活一个能够磷酸化 cofilin、抑制肌动蛋白纤维剪切和解聚的激酶（LIM 激酶）来稳定含有肌球蛋白的纤维。另外，Rho 家族蛋白参与酵母中甘油甲酸酯诱导的肌动蛋白纤维的成核过程的激活。

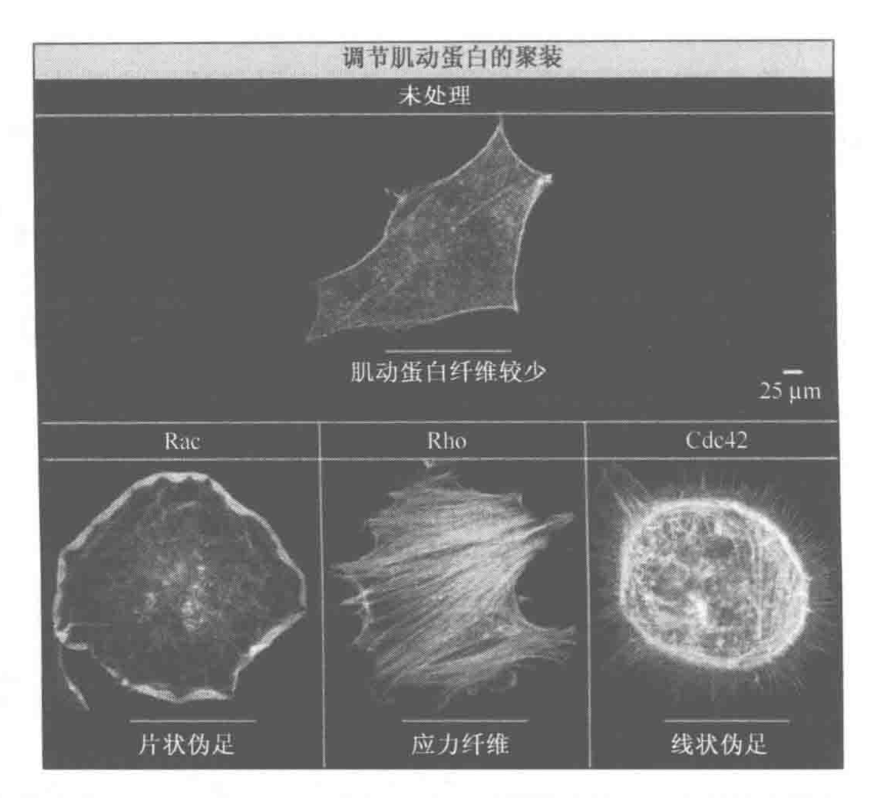


图 8.23 细胞中 Rac、Rho 和 Cdc42 的活化诱导不同类型肌动蛋白结构的形成，正如荧光标记的肌动蛋白纤维照片所示。照片由 MRC 分子细胞生物学及细胞生物学实验室的 Alan Hall 惠赠，复制自 A. Hall. 1998. *Science*. 279：509-514。© 1998 AAAS。

8.15 肌球蛋白是基于肌动蛋白的分子马达并在许多细胞过程中起着必要的作用

关键概念

- 肌球蛋白是能量转换机器，它利用 ATP 来推动沿着肌动蛋白纤维的运动并产生力。
- 基于肌动蛋白的分子马达的肌球蛋白超家族包括至少 18 个种类，许多种类还具有多种亚型。
- 某些肌球蛋白为肌肉和细胞收缩提供能量，而其他的为膜和囊泡的转运提供能量。
- 肌球蛋白在调控细胞形状和极性中起着重要作用。
- 肌球蛋白参与信号转导和感应途径。

肌球蛋白是利用所结合的 ATP 的水解获得的能量产生力的分子马达蛋白，为沿着肌动蛋白纤维的运动提供能量。了解最多的是肌球蛋白在肌肉收缩中的作用（见8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能）。然而，肌球蛋白的表达并不局限于肌肉中，相反肌球蛋白构成了一个大家族，它的成员在几乎所有类型的真核细胞中广泛表达。不同肌球蛋白家族成员具有为了特殊的细胞功能所进化的不同结构和生化适应性。

基于肌动蛋白的分子马达的肌球蛋白超家族包括至少 18 种类型（或家族），许多类型还具有多种亚型。肌球蛋白的类型是按照蛋白质序列的系统发育分析辨别的。

所有已鉴定的肌球蛋白，除了肌球蛋白Ⅵ，都是向着肌动蛋白纤维的倒刺端运动。在不同细胞或组织中表达的肌球蛋白的类型和数量明显地不同。例如，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）表达5种属于3类不同的肌球蛋白，而人类有属于12个家族的40个基因。

肌球蛋白超家族的成员具有必要的以及显著的若干细胞功能。它们一般具有三个结构域（头部结构域或马达结构域、调控结构域和尾部结构域），它们进化成这样以便适应细胞中多种多样的机械和调控角色。马达和调控结构域为细胞运动供能，尾部结构域在肌球蛋白装配或与其他运输的细胞成分的联结中发挥作用（见8.16肌球蛋白具有三个结构域）。在认识肌球蛋白在细胞中的功能及马达和尾部结构域如何行使这些功能方面取得了许多进展。图8.24显示不同肌球蛋白家族的功能，图8.25总结了肌球蛋白结构域的性质，图8.26所示为人类肌球蛋白的表达形式。已知的肌球蛋白可以被分成四大功能组：

为肌肉以及细胞收缩供能的肌球蛋白。肌球蛋白Ⅱ家族的亚型产生骨骼肌、心肌和平滑肌的强大收缩力（见8.21肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能）。肌球蛋白Ⅱ家族的成员也负责在胞质分裂中收缩环的收缩，以及细胞迁移和全细胞收缩等。

为膜和囊泡运输供能的肌球蛋白。基于微管的马达执行通过胞质溶胶的膜囊的长距离运输（见第7章微管）。然而，一些肌球蛋白在短范围运输以及囊泡和细胞器的分配调控中起着重要的作用。例如，持续的马达肌球蛋白Ⅴ运输使皮肤和毛发具有颜色的含有色素的细胞器，而一些其他的肌球蛋白，例如肌球蛋白Ⅰ、Ⅵ、Ⅸ和Ⅹ的亚型，在内吞和吞噬泡的形成和运输中发挥功能。

在调控细胞形状和极性中发挥重要作用的肌球蛋白。一些富含肌动蛋白的细胞表面特化结构的形成和动态需要肌球蛋白，如丝足、静纤毛和伪足。例如，某些肌球蛋白Ⅰ亚型将脂膜和肌动蛋白骨架联系起来，并为富含肌动蛋白的膜突出的相互作用供能；肌球蛋白Ⅱ的亚型在维持细胞形状的张力丝和皮质肌动蛋白索中提供收缩力；肌球蛋白Ⅶ为肌动蛋白骨架和细胞外黏着提供一种收缩性的联系。

参与信号转导以及感知途径的肌球蛋白。肌球蛋白通过与信号蛋白结合参与信号转导。例如，肌球蛋白Ⅰ调控某些钙通道的活性；肌球蛋白Ⅲ与眼睛光感受器的信号分子相互作用；肌球蛋白Ⅸ据推测可能是Rho的调控因子；以及肌球蛋白ⅩⅥ可能作用于一些磷酸酶，后者特化一些细胞区域。肌球蛋白在感知途径中也是十分重要的。编码肌球蛋白Ⅵ、Ⅶ和ⅩⅤ的基因的自然突变可以引起耳朵感觉毛细胞中的肌动蛋白纤维结构的破坏，从而导致听觉丧失。

在下一节中我们将会讨论肌球蛋白的结构，所有已知的肌球蛋白的产生力的基本性质，以及这些性质与他们的生物功能有着怎样的联系（与微管作用的马达蛋白的细节见7.11基于微管的马达蛋白介绍；在酵母细胞分裂中肌球蛋白的功能的细节见7.14微管的动力学作用和马达蛋白共同造就了细胞的非对称性组织结构）。

肌球蛋白的表达以及功能		
肌球蛋白家族	有机体	细胞功能
Ⅰ	真菌； 原生动物； 所有后生动物	• 连接肌动蛋白细胞骨架和脂膜 • 膜运输 • 机械信号转导 • 质膜动态
Ⅱ （通常所说的肌球蛋白）	真菌； 原生动物； 所有后生动物	• 为心肌、骨骼肌和平滑肌的收缩供能 • 非肌肉同型体具有多种功能，包括： —胞质分裂 —蠕动 —决定细胞形状 —调控细胞极性
Ⅲ	脊椎动物； 鲎属； 果蝇	• 感觉细胞功能，包括光感受器中信号分子的运输 • 一个人类同型体的突变导致耳聋
Ⅳ	阿米巴属 （一种原生动物）	• 未知
Ⅴ	大部分真核生物细胞	• 为小范围囊泡运输和扩散供能 • 在 mRNA 的定位中起作用
Ⅵ	后生动物	• 承担内吞和膜运输的任务 • 可能具有微丝骨架结构的组装作用
Ⅶ	后生动物； *Dictyostelium*	• 细胞黏着，吞噬作用以及肌动蛋白细胞骨架结构的组织 • 人类基因的突变导致耳聋
Ⅷ	植物	• 可能在内吞作用以及细胞周围肌动蛋白的组织中起作用
Ⅸ	脊椎动物；*C. elegans*	• 调控信号活性
Ⅹ	脊椎动物	• 可能的膜相关物质运载体 • 关联磷酸肌醇信号与吞噬作用 • 参与核定位
Ⅺ	植物；*Dictyostelium*	• 可能的物质运载体，与肌球蛋白Ⅴ相似
Ⅻ	脊椎动物	• 未知
XIII	秀丽新小杆线虫	• 可能在细胞器的转运和 algaltip 的生长中起作用
XIV	伞藻属（一种绿藻）	• 为滑动运动和侵入寄主细胞供能
XV	弓浆虫属； 原质团	• 可能在维持像内耳中的次级毛发细胞一样的富含肌动蛋白结构的形成或维持中起一定的作用 • 在人类和小鼠中突变导致耳聋
XVI	脊椎动物；果蝇	• 可能对准发育中的大脑细胞的特定区域磷酸化
XVII	脊椎动物	• 可能在极化的细胞壁的合成和真菌形态发生中起作用
XVIII	真菌	• 未知

图 8.24　18 种肌球蛋白家族综述，它们表达的有机体以及它们的功能。某些肌球蛋白的功能是未知的。

肌球蛋白结构的、生化的以及马达的性质		
肌球蛋白家族	结构特征	生化以及马达性质
Ⅰ	• 单头分子 • 所有已知的同型体都有一个与酸性磷脂结合的尾部结构域 • 一些同型体含有 Src 同源 3（SH3）结构域和核苷酸不敏感的肌动蛋白结合位点	• 非加工的低负载比马达
Ⅱ（常规肌球蛋白）	• 二重螺旋结构可聚合形成双极性纤维	• 已知的肌肉的同型体是低负载比马达至少一个非肌肉同型体有一个相对高的负载比并且表现出对缓慢并持久的收缩的适应
Ⅲ	在马达结构域的 N 端含有一个激酶结构域	• 呈现出低负载比马达
Ⅳ	尾部结构域含有一个 SH3 结构域和其他的蛋白质-蛋白质相互作用结构域	• 未知
Ⅴ	• 二重螺旋结构域可二聚体化形成双头分子 • 蛋白已经被证实与尾部结构域结合，特异结合细胞器	• 高负载比马达 • 双头肌球蛋白Ⅴ能够在分离之前沿肌动蛋白纤维行进多步
Ⅵ	• 马达结构域包含一段可使肌球蛋白Ⅵ朝向肌动蛋白纤维尖端运动的插入片段	• 可能作为一个监控者和二聚体存在的高负载比马达 • 在分离之前可沿肌动蛋白纤维行进多步的二聚体
Ⅶ	• 可二聚体化形成一个双头分子 • 至少一种同型体的尾部结构域与细胞骨架蛋白踝蛋白结合	• 在分离前能够沿着肌动蛋白纤维进行几个步骤的高负载比马达
Ⅷ	• 包含一个能够二聚体化的二重螺旋结构域 • 马达结构域含有一个功能未知的 N 端延伸	• 未知
Ⅸ	• 可能是一个 RhoGAP • 马达结构域在肌动蛋白结合位点含有一个大的插入片段并且含有一个与 Ras 结合结构域结构同源的次级插入片段	• 可能是一个单头前进马达 • 可能朝着肌动蛋白纤维的尖端移动
Ⅹ	• 尾部结构域具有血小板-白细胞 C 激酶底物同源性以及蛋白质-蛋白质相互作用结构域	• 低负载比马达
Ⅺ	• 二重螺旋结构域二聚体化形成双头分子	• 持续高负载比马达

（续图）

肌球蛋白结构的、生化的以及马达的性质		
肌球蛋白家族	结构特征	生化以及马达性质
Ⅻ	• 马达结构域含有特殊的未知功能插入片段 • 尾部结构域含有蛋白质-蛋白质相互作用结构域	• 未知
XⅢ	• 马达结构域含有一个未知功能的 N 端延伸	• 未知
XⅣ	• 短的尾部结构域有一个隐藏的调控结构域	• 非生产性的低负载比马达
XV	• 短的尾部结构域含有 MyTH4 和 FERM 结构域	• 未知
XⅥ	• 马达含有一个由重复的磷酸化结合锚蛋白构成的 N 端延伸 • 尾部结构域包含几个多脯氨酸重复序列	• 未知
XⅦ	• 尾部结构域含有一个几丁质合酶结构域	• 未知
XⅧ	• 一个同型体含有包含一个像蛋白质相互作用支架一样作用的 PDZ 结构域的 N 端 • 尾部结构域含有二重螺旋和球形的 C 端尾部	• 未知

图 8.25　肌球蛋白家族的结构特征和动力学特点。

人类肌球蛋白的表达		
肌球蛋白家族	基因数量	表达
Ⅰ	8	广泛表达
Ⅱ	14	分成肌肉和非肌肉基因；非肌肉基因广泛表达
Ⅲ	2	视网膜（眼）、睾丸、肾、肠和球囊（耳）
Ⅴ	3	广泛表达
Ⅵ	1	广泛表达
Ⅶ	2	在一些组织中差别表达，包括视网膜（眼）、肺、睾丸和肾
Ⅸ	2	广泛表达
Ⅹ	1	广泛表达
XV	2	在耳蜗、脑垂体、胃、肾、肠和结肠中差别表达
XⅥ	2	脑、肾和肝
XⅧ	2	在早血（血液形成）细胞、肌肉和肠中差别表达

图 8.26　人类肌球蛋白家族蛋白及其表达模式。

8.16 肌球蛋白具有三个结构域

关键概念

- 肌球蛋白家族成员具有三个结构域，包括头部（马达）、调控和尾部结构域。
- 马达结构域包括 ATP 和肌动蛋白结合位点并且负责将从 ATP 水解中得到的能量转化成机械功。
- 在大部分肌球蛋白中，调控结构域像一个力转换杠杆臂一样起作用。
- 肌球蛋白的尾部结构域与所运输的囊泡上的蛋白质或脂类相互作用并决定其生理功能。

肌球蛋白家族成员通常包含三个结构域。即马达、调控和尾部结构域，如图 8.27 所示。80kDa 左右的马达结构域含有 ATP 和肌动蛋白结合位点并负责将 ATP 水解所释放的化学能转换成机械功。具催化活性的马达结构域在所有肌球蛋白超家族成员中是高度保守的，并且是判断一个蛋白质是否为肌球蛋白的依据。

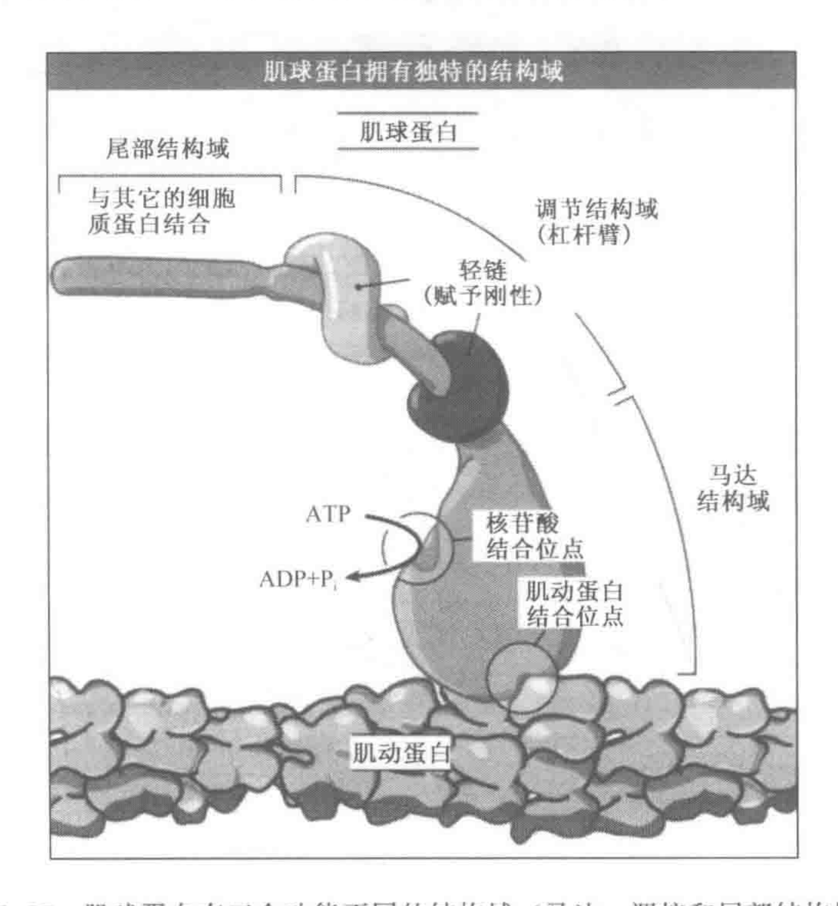


图 8.27 肌球蛋白有三个功能不同的结构域（马达、调控和尾部结构域）。

调控结构域是轻链（这是由于它们比肌球蛋白“重链”的分子质量要低）蛋白的结合区域。大部分轻链是钙调蛋白或钙调蛋白样蛋白（见 14.15 所有真核细胞中钙离子信号都具有多种作用）。对于所结合的轻链的识别取决于肌球蛋白的亚型和有机体的发育阶段。结合的轻链数量取决于肌球蛋白的亚型。轻链通常与肌球蛋白维持紧密的结合，并被认为是肌球蛋白分子的亚基。轻链的磷酸化修饰或钙的结合可调控某些肌球蛋白的运动和 ATP 酶活性（见 8.20 肌球蛋白受多重机制调控）。

马达和调控结构域对于力的产生是充分和必要的，正如图 8.28 所示的体外运动分析所证实的那样。

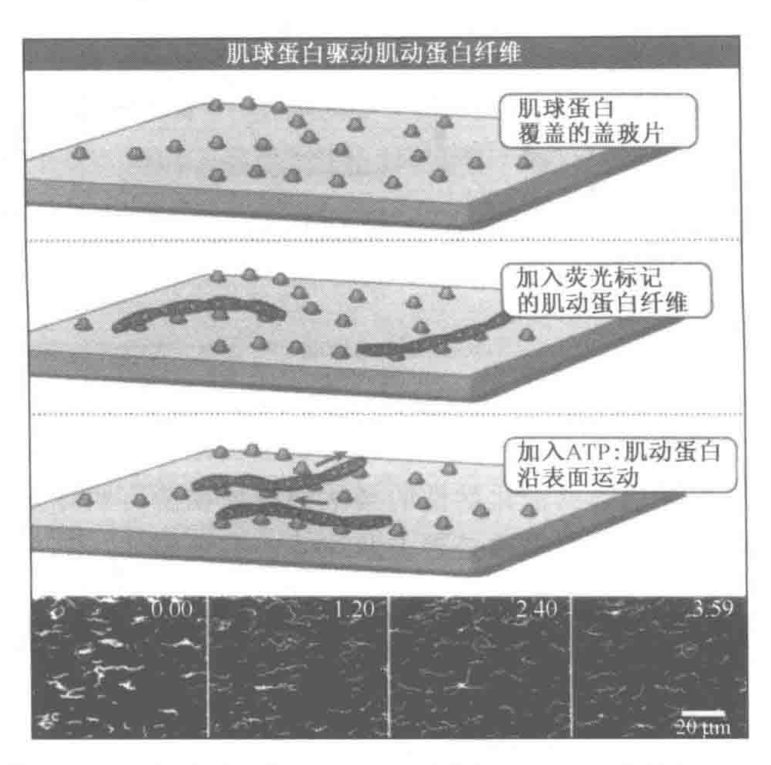


图 8.28 体外运动分析实验表明仅有马达和调控结构域的肌球蛋白片段能够驱动肌动蛋白纤维。照片所示为肌动蛋白运动的视频截图。图中圈出的为单根肌动蛋白纤维。照片由 Pennsylvania 大学的 Tianming Lin 和 E. Michael Ostap 惠赠。

肌球蛋白的马达和调控结构域的 X 射线晶体结构如图 8.29 所示，它为力的产生机制的重要线索。肌球蛋白具有一个拉长的结构，它包含马达结构域，马达结构域含有由 α 螺旋包围的 β 折叠核心。该结构与基于微管的马达蛋白-肌动蛋白的相应结构也十分相似（如图 7.51），尽管这两个马达的序列之间缺少保守性（见 7.11 基于微管的马达蛋白介绍）。与 ATP 酶和 G 蛋白一样，ATP 结合位点与 ATP 的磷和所结合的镁离子结合。与 ATP 结合位点结合的核苷酸改变肌动蛋白结合位点和调控结构域的构象。分子末端的肌动蛋白结合位点有一个大的裂隙，距离 ATP 结合位点大约 4nm。与肌球蛋白结合的核苷酸影响这个裂缝的开启和闭合，进而影响肌球蛋白与肌动蛋白的结合。当 ATP 与肌球蛋白结合，裂缝轻轻开启，由此降低肌球蛋白对肌动蛋白的亲和力。

调控结构域是从马达结构域延伸出的一段长的 α 螺旋（如图 8.29)。肌球蛋白的调控结构域在肌球蛋白的功能中起着重要的机械作用，作为一个产生力的“杠杆臂”发挥作用。在核苷酸结合位点由于 ATP、ADP-P_i 或者 ADP 的结合而引起的构象改变，从马达结构域传至调控结构域。这种构象的改变造成杠杆臂的转动，形成一个产生力的**做功冲程**，如图 8.30 所示（在 8.17 肌球蛋白水解 ATP 是多级反应中会对做功冲程进行更详细的讨论）。轻链使调控结构域的结构稳定，使它能够成为一个硬杠杆。

肌球蛋白的尾部结构域负责结合其他的蛋白质和脂类，和（或）肌球蛋白分子的自



图 8.29 含有马达和调控结构域的肌球蛋白片段的 X 射线晶体结构，用带状图表示蛋白质主链。图像来源于 Protein Data Bank file 2MYS。

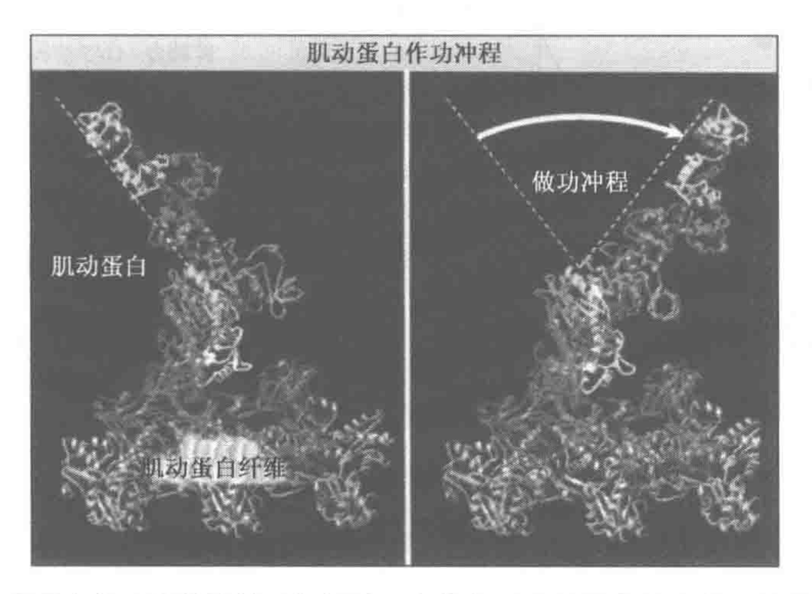


图 8.30 肌球蛋白的调控结构域（杠杆臂）的构象可以有很大的改变，从而产生沿肌动蛋白纤维运动的力。ATP 的水解和 P_i 的释放在肌动蛋白结合的裂缝处诱导了一个小的构象变化，并进而引起整个构象的大变化。照片由 Max Plank Institut Für Medizinische Forschung 的 kenneth C. Holmes 惠赠。复制自 Holmes，k.，et al.，*Phil. Trans. R. Soc.*，359：pp. 1819-1828（2004），获得皇家协会版权许可。

联作用。肌球蛋白尾部结构域的序列和结构在肌球蛋白超家族中是高度可变的。在许多肌球蛋白中，尾部结构域含有已知的负责蛋白质-蛋白质相互作用的亚结构域，如图 8.31 所示。不同的尾部运输的特定物质（蛋白质或脂类），某些肌球蛋白能够形成二聚

体或寡聚体化形成纤维，使得它们具有两个或更多的催化马达结构域。横纹肌的粗丝就是这种肌球蛋白纤维的一例（见 8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能）。尾部结构域序列的变异是对每种肌球蛋白类型特殊的细胞功能的适应（见图 8.24）。

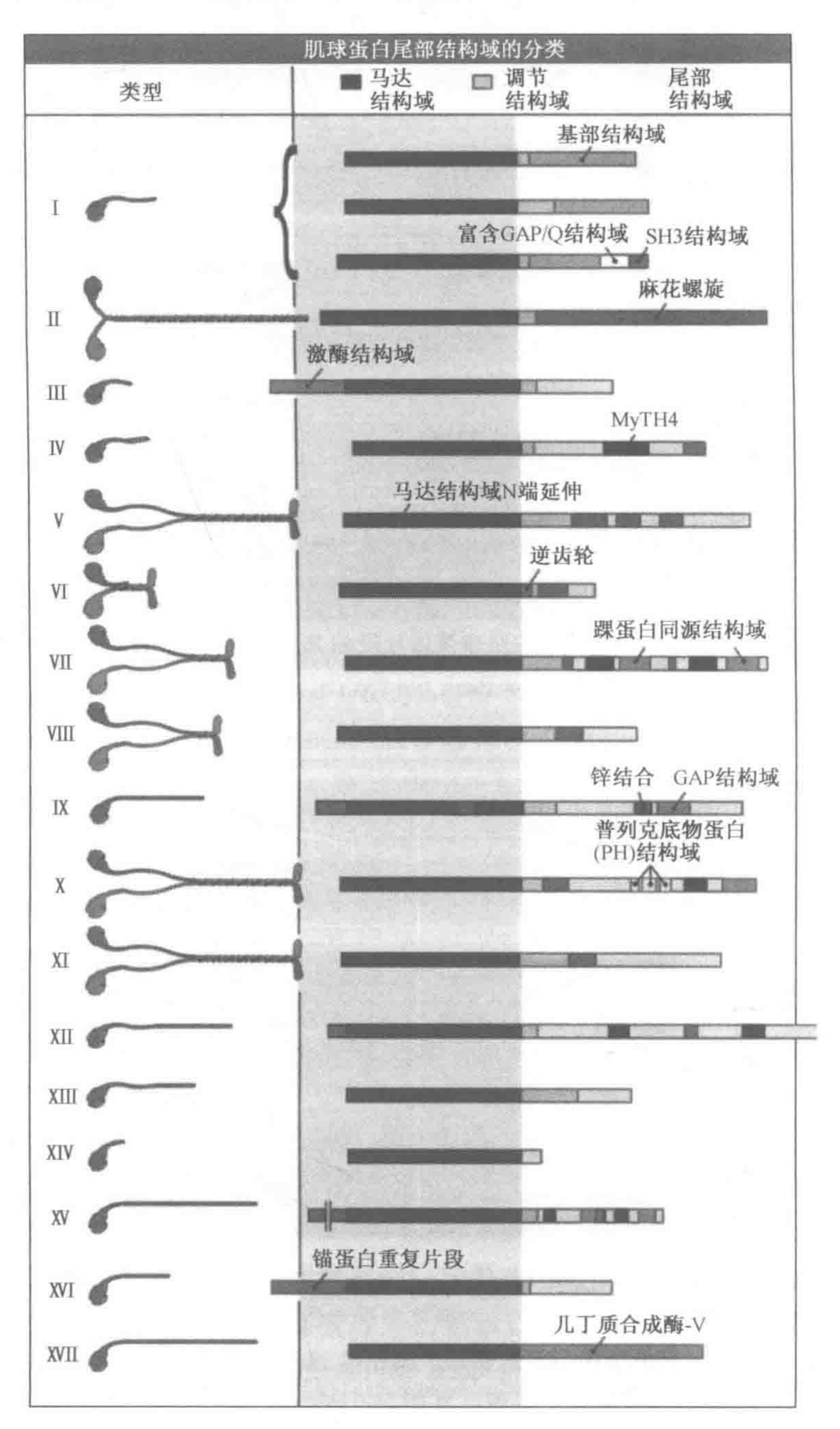


图 8.31　肌球蛋白尾部结构域具有特殊的功能。某些尾部结构域含有聚合形成肌球蛋白纤维的区域，而其他的则与运载蛋白结合或者具有酶的功能。

8.17 肌球蛋白水解 ATP 是多级反应

关键概念

- 肌球蛋白超家族的成员具有保守的 ATP 水解反应途径。
- 肌球蛋白对于肌动蛋白的亲和力取决于 ATP、ADP-P_i 或 ADP 是否与肌球蛋白的核苷酸结合位点相结合。
- 与 ATP 或 ADP-Pi 结合的肌球蛋白处于弱结合状态。
- 在这种弱的结合状态中，肌球蛋白快速地与肌动蛋白结合或脱离。
- 肌球蛋白连接到肌动蛋白上的时候，ATP 水解“激活”肌球蛋白。
- 在 ADP-P_i 肌球蛋白重新与肌动蛋白结合后，肌球蛋白完成其产生力的做功冲程并伴随着磷的释放。
- 与 ADP 结合或者没有核苷酸结合的肌球蛋白处于强结合状态。
- 处于强结合状态的肌球蛋白与肌动蛋白的连接维持的时间更长。
- 处于弱结合状态的肌球蛋白不能承受力的作用。
- 当施加外力时，处于强结合状态的肌球蛋白抗拒移动。

目前为止已知的所有肌球蛋白都具有一个相似的 ATP 水解成 ADP 和 P_i 的总反应途径。图 8.32 概括的反应图显示肌球蛋白 ATP 酶途径产生杠杆臂转动的机制。这种 ATP 水解和构象改变的耦联使得肌球蛋白能够使其本身和它所携带的货物得以沿着肌动蛋白纤维移动。

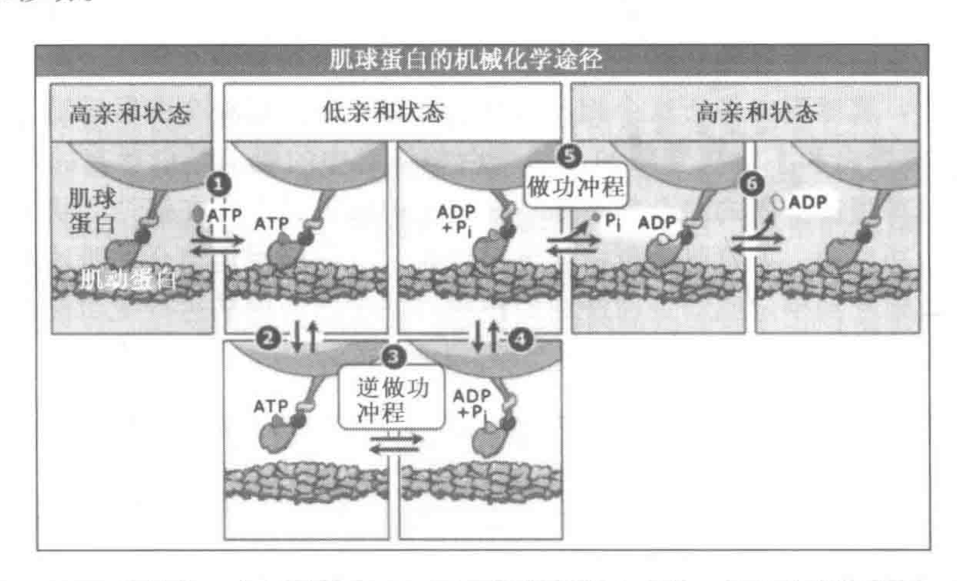


图 8.32 ATP 的结合、水解以及 P_i 和 ADP 被肌球蛋白释放，这些步骤每循环一次，就使得肌球蛋白能够沿着肌动蛋白纤维前进一步。伴随着 ATP 酶循环的构象改变导致肌球蛋白对于肌动蛋白亲和力的改变，使得肌球蛋白交替地与肌动蛋白结合、释放。

当缺少 ATP 时，肌球蛋白紧密地、立体特异性地与肌动蛋白纤维结合，形成一种通常被称作僵滞复合体的结构［死亡以后，ATP 水平下降，肌肉由于这种坚硬的肌动蛋白-肌球蛋白（或称肌动球蛋白）联结物而变得僵硬，造成僵滞尸斑］。

ATP 与肌球蛋白的结合（图中的步骤 1）打开了肌球蛋白的肌动蛋白结合裂隙，

由此减弱了肌动球蛋白的相互作用。这导致了肌球蛋白从肌动蛋白上脱离（步骤 2）。在此构象状态下，肌球蛋白与 ATP 紧密结合但是并不水解 ATP，这是由于需要化学催化的氨基酸侧链没有在正确的位置攻击 ATP 的 β-γ 磷酸键。

肌球蛋白构象的第二次改变使得 ATP 水解成 ADP 和 P_i，ADP 和 Pi 维持与肌球蛋白非共价的结合（步骤 3）。这种构象的变化包括含有马达结构域的结构单位的移动，导致调控结构域的转动。作为肌球蛋白杠杆臂的调控结构域转动并处于前做功状态，在这种状态下肌球蛋白被竖起，为产生力的做功冲程做准备。

当不与肌动蛋白结合时，在前做功冲程状态下磷从肌球蛋白中的释放是十分缓慢的。这使我们确信肌球蛋白在没与肌动蛋白结合时是不会浪费 ATP 的。通过与肌动蛋白结合（步骤 4），磷从肌球蛋白上的释放被极大地加速。肌球蛋白产生力的做功冲程，也就是调控结构域的转动（步骤 5），伴随着磷的释放。通过做功冲程的完成，ADP 被释放（步骤 6），产生与肌动蛋白连接的不含核苷酸的肌球蛋白。接着 ATP 与肌球蛋白结合，这个循环重复进行。每一个 ATP 结合、ATP 水解和磷的释放的循环都导致沿着肌动蛋白纤维移动 5～25nm，位移取决于肌球蛋白的类型（见 8.19 肌球蛋白产生纳米级的移动和皮牛顿级的力）。

在 ATP 水解循环期间，肌球蛋白对于肌动蛋白的亲和力不断改变。在此循环中的中间状态可以根据它们对于肌动蛋白纤维的亲和力来确定。与 ATP 或 ADP-Pi 结合的肌球蛋白处于“弱结合”或“前产生力”状态（步骤 2 和 4），在此状态下，肌球蛋白与肌动蛋白纤维快速地结合和脱离，比 ATP 水解循环快 100 倍以上。这些弱结合状态不能够承受力。如果在这种状态下肌动蛋白纤维被相对地拉向肌球蛋白，肌球蛋白会滑过纤维，这是由于肌球蛋白与肌动蛋白的结合和脱离都十分地迅速。在弱结合状态下，肌球蛋白转动成前做功冲程状态，并且为了产生力的步骤而使它自己竖起。如果与肌动蛋白纤维结合，肌球蛋白经历这个相反的做功冲程步骤，它将会向后运动。

ADP-肌球蛋白和不含核苷酸的肌球蛋白与纤维中的肌动蛋白亚基的特异位点紧密结合。这种肌球蛋白坚固的结合状态是“承力”中间态。正是在强结合状态下，肌球蛋白进行它的做功冲程。如果肌动蛋白纤维被牵拉，与它坚固地结合的肌球蛋白将会抗拒移动，并有效地起到锚定肌动蛋白纤维的作用（基于微管的马达行使功能的机制的细节见 7.12 马达蛋白是怎样发挥功能的）。

8.18 肌球蛋白马达具有适于其细胞功能的动力学特征

关键概念

- ATP 酶循环机制在所有肌球蛋白中都是保守的。
- 不同肌球蛋白的 ATP 酶循环动力学是与特定的生物学功能相协调的。
- 具有高负载比的肌球蛋白的循环中大部分时间都是与肌动蛋白结合的。
- 低负载比肌球蛋白花费大部分时间从肌动蛋白上脱离。
- 某些高负载比肌球蛋白是前进的并沿肌动蛋白纤维“行走”很长一段距离。

所有的肌球蛋白都具有上一节中所提到的机械化学途径。然而，不同肌球蛋白亚型的马达结构域具有为了“适应”特定的细胞功能所进化出的生化和机械的特点，如图

8.24 和图 8.25 所示。例如，以单独的形式或者小组的形式来在肌动蛋白纤维表面移动细胞器的肌球蛋白与以有组织的纤维来产生强大的力并支持快速的收缩（例如在肌肉中）的肌球蛋白相比具有不同的性质。不同肌球蛋白的特殊性质来源于 ATP 酶循环的各个步骤之间的过渡的比例系数的不同，而不是整个 ATP 酶反应途径的不同。不同的系数导致肌球蛋白整个的 ATP 酶循环的不同比率和不同的肌球蛋白**负载比**。负载比可以被定义成一个单独的马达（通常是强结合状态的）与肌动蛋白结合在总的 ATP 酶循环的时间中所占的部分，如图 8.33 所示。

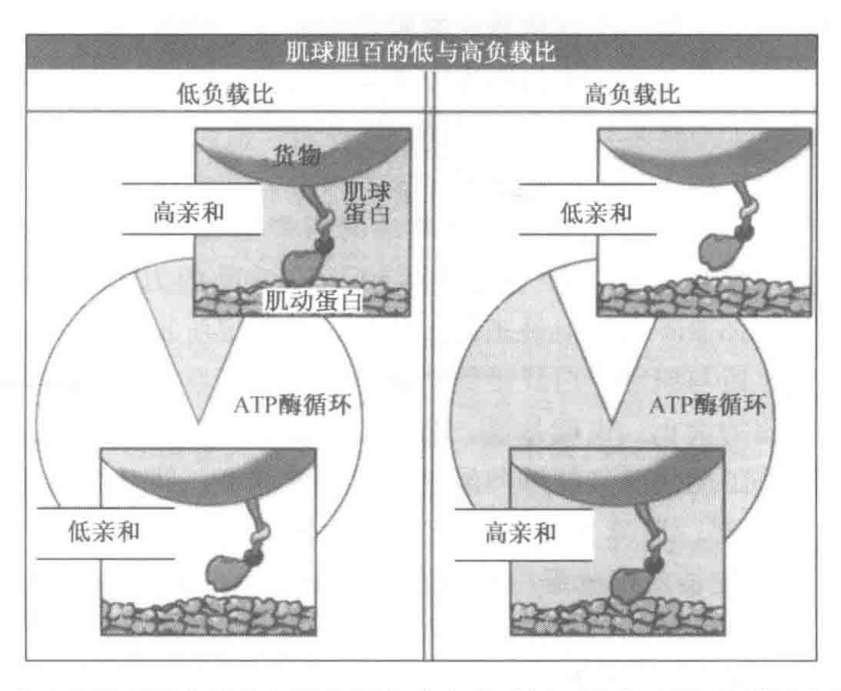


图 8.33　负载比是肌球蛋白马达与肌动蛋白结合的时间在整个 ATP 酶循环中所占的比例。

在由许多单体组成的大的集合中工作的肌球蛋白通常是低负载比的。在一个含有数千个马达结构域的肌球蛋白纤维中（例如，在肌肉的粗丝中），每一个马达都需要与肌动蛋白结合，完成一个做功冲程，并且在不妨碍同一个集合中其他的肌球蛋白的前提下从肌动蛋白上快速地脱离。如果其中一个肌球蛋白马达与肌动蛋白结合时间过长，在微管装配的时候它就会妨碍其他的肌球蛋白完成它们的做功冲程，并且抑制像肌肉收缩时发生的一样的滑行（见 8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能）。

高负载比的肌球蛋白在分离之前能够沿着肌动蛋白纤维前进很多步。设想一个二聚体的肌球蛋白（例如肌球蛋白Ⅴ）沿着一个肌动蛋白纤维运输一个细胞器。如果它的两个马达结构域都从肌动蛋白上分离，热量会使得肌球蛋白分子从它的轨道上分散开。因此，为了运输的正常进行，必须至少总是有一个马达是与肌动蛋白维持结合的。这些前进的双头肌球蛋白是与 ATP 酶双头的活性相一致的，以使得交替的行走活性能够被很好地同步化。

8.19　肌球蛋白产生纳米级的移动和皮牛顿级的力

关键概念

- 单分子肌球蛋白可产生足够的力（几皮牛顿）来运输生物分子和囊泡。
- 肌球蛋白冲程的大小与它的“杠杆臂”的长度成比例。

尽管肌球蛋白是催化 ATP 水解成 ADP 和 Pi 的酶，但是这个生物过程的主要后果却不是 ADP 和 Pi，而是产生力。在生理溶液条件下，从一分子 ATP 的水解中可以得到的做功量大约是 80pN-nm，pN 是皮牛顿（10^{-12} 牛顿）的简写形式，nm 是纳米（10^{-9}米）的简写形式。作为参考，1 pN 大约是一个红细胞的重量，1nm 约是一条 DNA 的半径。肌球蛋白能够将从 ATP 水解中所获得的总能量的 50%转化成有用功（其余的能量以热量的形式散失），因此肌球蛋白实际上每个 ATP 可以产生约 40pN-nm 的功。这看起来可能不是很多，但是这些能量已经是在体温条件下的热能的 10 倍，并且足够一个肌球蛋白分子将一个细胞器在细胞质中易位。然而，在肌肉组织中需要数百万肌球蛋白同时工作才能在我们更为熟悉的水平上做功；例如，从地面上将一个装满食品的杂货袋提到桌子上需要大约 50N-m 的能量。

单分子肌球蛋白所产生的力的总量可以用光阱的力学光谱来测量。该技术可以测量单一肌球蛋白分子沿着一条肌动蛋白纤维移动时所产生的力（见TECH：8-0001）。不同的肌球蛋白亚型每水解一个 ATP 分子产生约 5～10pN 的力（单纯的力）。尽管所有的肌球蛋白产生的力都差不多，但是正如生化动力学测定所预测的那样，不同的肌球蛋白在经历做功冲程之后与肌动蛋白纤维维持强结合的时间有着明显的不同。

另外，单位冲程的大小，也就是说，肌球蛋白每水解一分子 ATP 所产生的位移是明显不同的。单位分子测量已经能够测量单位冲程的大小，并且为理解肌球蛋白运动的杠杆臂机制提供了证据。肌球蛋白冲程的大小也取决于调控结构域转动的角度，图 8.34 显示调控结构域较长的肌球蛋白比调控结构域短的肌球蛋白的做功冲程大。肌球蛋白的滑动速度（v）等于单位时间（t）内移动的距离（d），$v=d/t$ 。因此，对于有

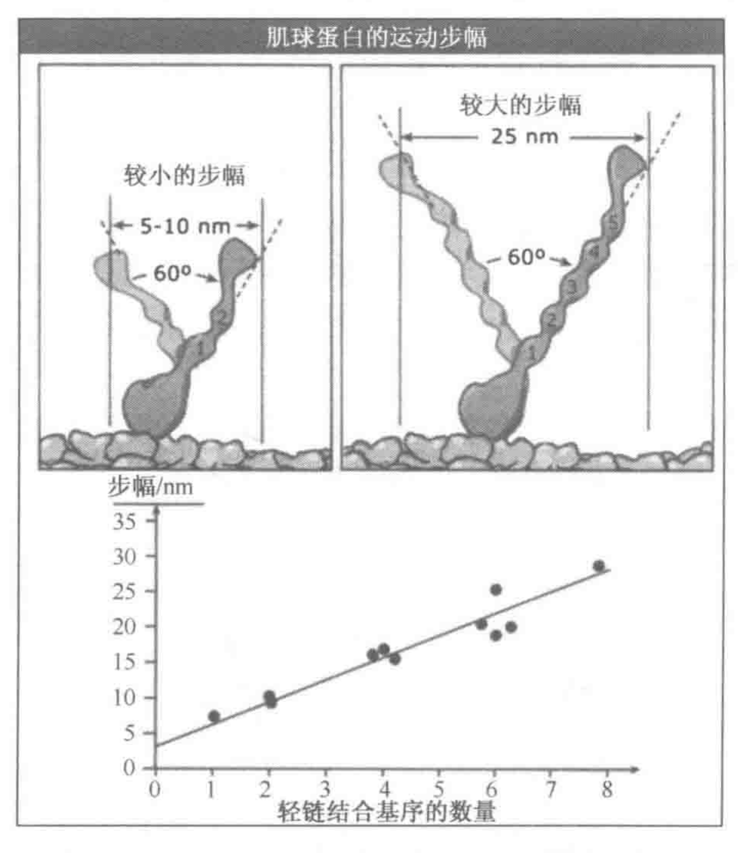


图 8.34　一个肌球蛋白水解一分子 ATP 所产生的位移取决于杠杆臂（调控结构域）的长度。修改自 Warshaw，D. M.，*J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2004. 25：467-474。

着相同的ATP酶速率的肌球蛋白，长冲程的肌球蛋白分子比较短冲程的肌球蛋白分子具有更快的滑动速度。

8.20 肌球蛋白受多重机制调控

关键概念

- 肌球蛋白产生力的活性及在细胞中的定位都是受到调控的。
- 肌球蛋白的功能受到磷酸化和与肌动蛋白结合蛋白或肌球蛋白结合蛋白的相互作用调控。

肌球蛋白产生力的活性和在细胞中的定位均受到其磷酸化水平和与肌动蛋白、肌球蛋白结合蛋白的相互作用所调控。研究最多的肌球蛋白活性调控因子是肌动蛋白纤维结合蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白，它们在横纹肌细胞中表达（见8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能）。在本节中，我们将会讨论通过肌球蛋白自身的调控和通过尾部结构域进行的调控。

某些肌球蛋白的活性受到结合在其调节构域上的轻链的磷酸化的调控。研究得最为清楚的是细胞质肌球蛋白Ⅱ和平滑肌肌球蛋白Ⅱ。这些肌球蛋白的每一个重链都与一个基本轻链和一个调节轻链结合。图8.35显示，肌球蛋白轻链激酶（MLCK）调节轻链的磷酸化作用激活肌球蛋白，肌球蛋白轻链磷酸酯酶（MLCP）的去磷酸化作用则抑制肌球蛋白的活性。当调节轻链没有被磷酸化时，肌球蛋白分子的两个马达结构域的相互作用方式对其水解ATP和与肌动蛋白结合的能力有抑制作用。此外，体外研究表明，未磷酸化的肌球蛋白分子可采取一种“折叠的”构象，而这可能会抑制肌球蛋白纤维的形成。然而，目前还不知道这种折叠的构象是否也存在于细胞中。调节轻链的磷酸化解除了肌球蛋白的抑制，诱导肌球蛋白纤维形成，并激活肌球蛋白的ATP酶活性。

钙及Rho家族小G蛋白参与的信号转导通路调节着MLCK和MLCP的活性，进而影响磷酸化的和未被磷酸化的肌球蛋白Ⅱ的总量。磷酸化的肌球蛋白Ⅱ装配成收缩性结构，包括张力丝（见图8.1）、细胞动力学收缩环，以及为平滑肌收缩提供能量的收缩纤维（信号通路的细节见第14章细胞信号转导原理）。

肌球蛋白家族的一些成员受到结合于轻链的钙的调控，但是关于这种调控方式的细胞学意义还有待于进一步了解。然而，已经十分清楚的是，肌球蛋白的ATP酶和运动活性的变化是对钙引起的轻链构象的变化做出的应答。

某些肌球蛋白的尾部结构域与货物结合，例如细胞内膜及蛋白质就是被肌球蛋白沿着肌动蛋白纤维运输的。肌球蛋白与被运输的货物的相互作用可由肌球蛋白尾部结构域的磷酸化来调节，也可由肌球蛋白的结合蛋白来调控。如图8.36所示，这两种机制都参与调控肌球蛋白Ⅴ（参与运输的双头肌球蛋白）的尾部。肌球蛋白Ⅴ尾部的磷酸化减弱了与细胞货物的结合，导致复合体解体。肌球蛋白的去磷酸化则促使与货物的结合，并沿着肌动蛋白纤维运输。节肌球蛋白Ⅴ也可以通过Rab家族小G蛋白与细胞货物相互作用。肌球蛋白Ⅴ与GTP-Rab高亲和力地结合，但是不与GDP-Rab结合。当肌球蛋白Ⅴ不与货物结合时，它可以采取一种折叠的构象来抑制它的ATP酶活性。

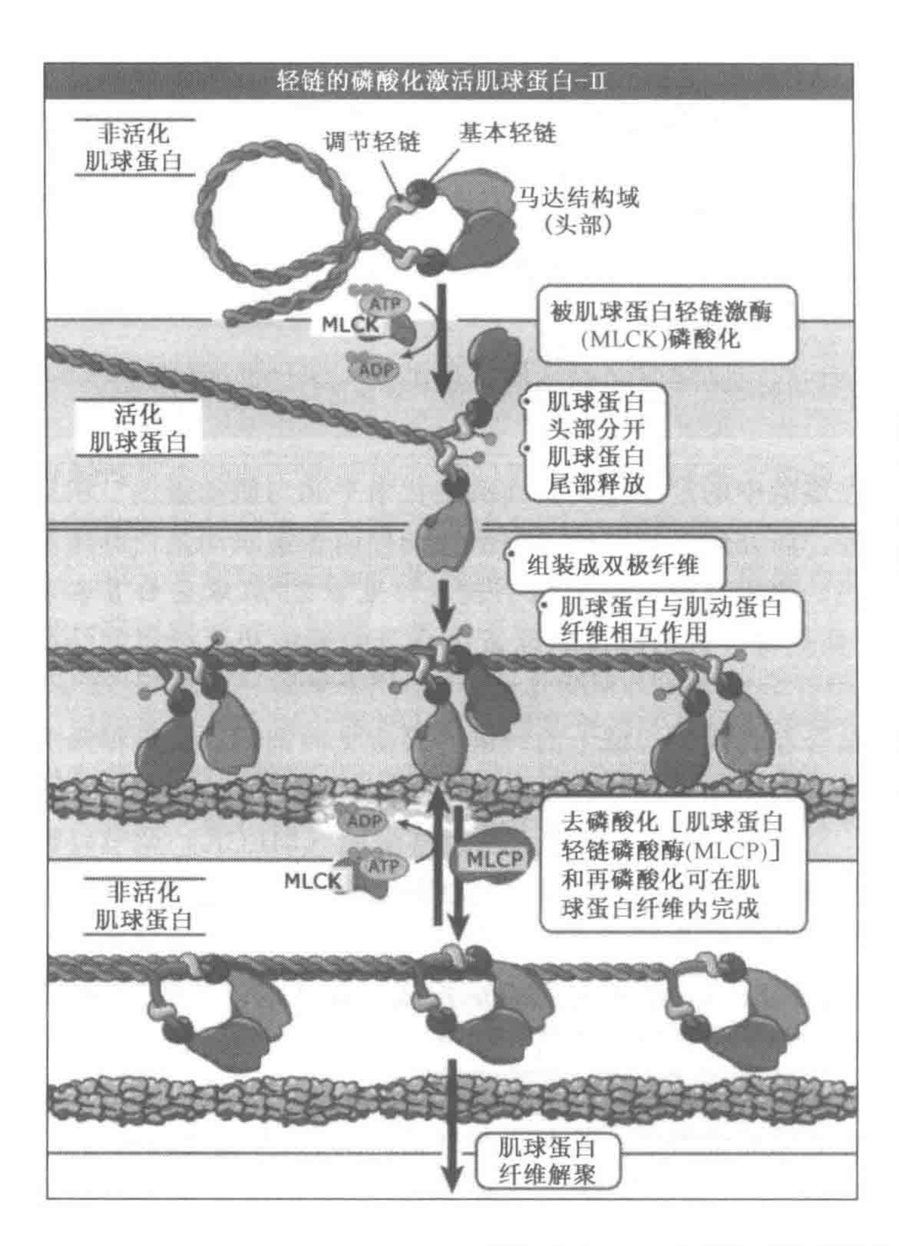


图 8.35　肌球蛋白轻链激酶对非肌肉肌球蛋白Ⅱ的磷酸化作用，通过促进肌球蛋白纤维的形成和促使肌球蛋白和肌动蛋白相互作用来激活肌球蛋白Ⅱ。当被肌球蛋白轻链磷酸酶去磷酸化后，肌球蛋白分子的两个马达结构域相互作用，抑制自身的活性。

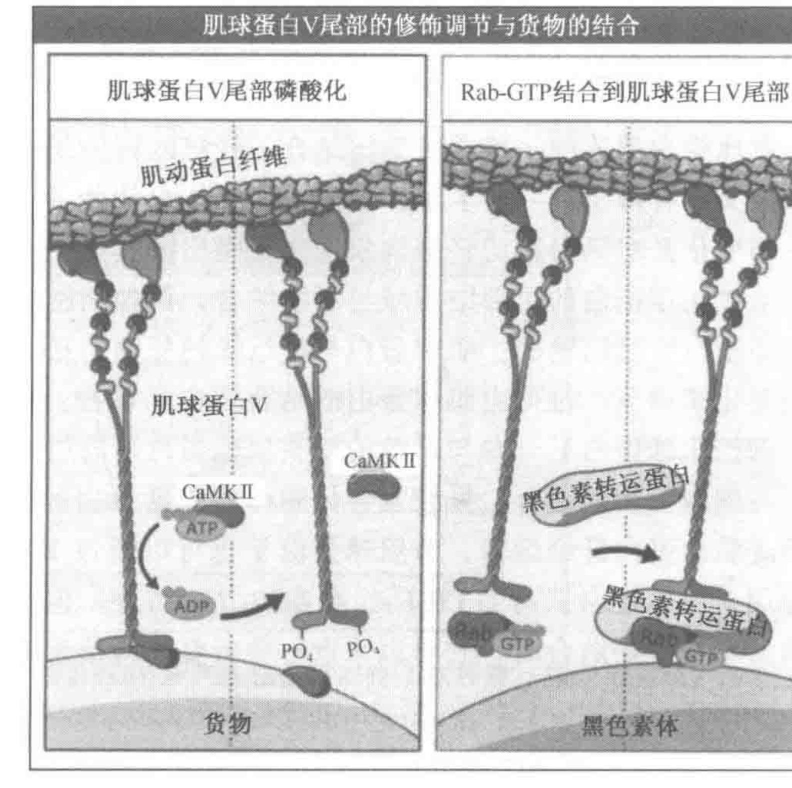


图 8.36　肌球蛋白Ⅴ结合并沿着肌动蛋白纤维运输囊泡。对于某些囊泡来说，磷酸化调控与肌球蛋白Ⅴ的结合，而对于其他的来说，例如黑色素体，Rab 蛋白调控结合。

8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能

关键概念

- **肌球蛋白Ⅱ是为肌肉收缩提供能量的马达。**
- **肌动蛋白和肌球蛋白Ⅱ是横纹肌基本收缩单位——肌小节主要的组成成分。**

肌肉是为身体运动和肌体内的运动提供能量的收缩组织。根据收缩纤维的外观可以将肌肉分成两个主要的类型：横纹肌和平滑肌。横纹肌纤维命名的原因是，在高倍镜下观察它们具有条纹状的外观，包括骨骼肌和心肌。骨骼肌负责骨骼的运动，心肌则负责心脏的收缩。平滑肌纤维不是条纹状的，它们是梭形的，主要在膀胱、血管和胃肠道等器官壁中被发现。

为平滑肌和横纹肌收缩提供能量的马达蛋白是肌球蛋白Ⅱ家族的一个成员（见图8.24）。肌球蛋白Ⅱ是在脊椎动物中含量最丰富的蛋白质之一，容易通过生化的方法分离，因此是研究得最为清楚的肌球蛋白之一。图8.37显示的一个肌球蛋白Ⅱ分子由六条多肽链组成：两条重链和分成两组的四条轻链。肌肉肌球蛋白Ⅱ尾部的末梢区域以尾-尾相连的形式与其他肌球蛋白Ⅱ分子结合，可形成约有300个肌球蛋白分子的纤维。肌球蛋白纤维是两极的，所有肌球蛋白的马达结构域向外形成一个中空的区域。这些肌球蛋白纤维被称作**双极粗肌丝**。在本节接下来的部分，我们将会讨论目前已经较好地了解的肌球蛋白Ⅱ的组装及在横纹肌收缩中的功能。

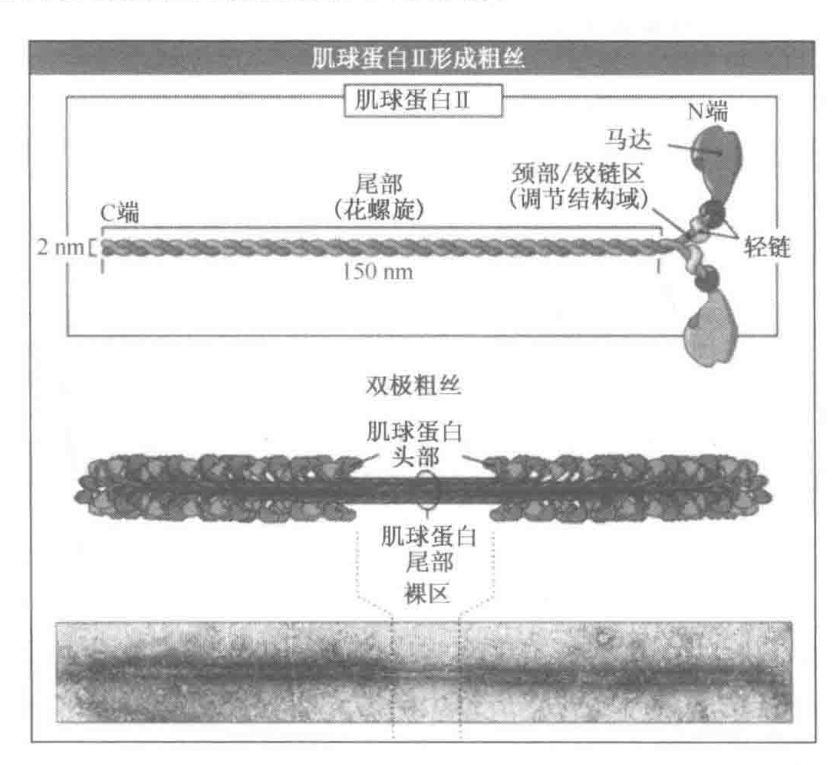


图8.37 肌球蛋白Ⅱ是一个六聚体，由两条重链和两对不同的轻链组成。复合体进一步装配成双极粗肌丝。

横纹肌组织含有肌纤维束。肌纤维是大的多核细胞，长度范围从几毫米到几厘米，直径为20～100μm。图8.38显示每一个肌纤维含有超过100个肌原纤维，肌原纤维是

杆状收缩细胞器。肌原纤维含有被称作**肌小节**的重复单位，它们首尾相接并使得肌肉显现出条纹。

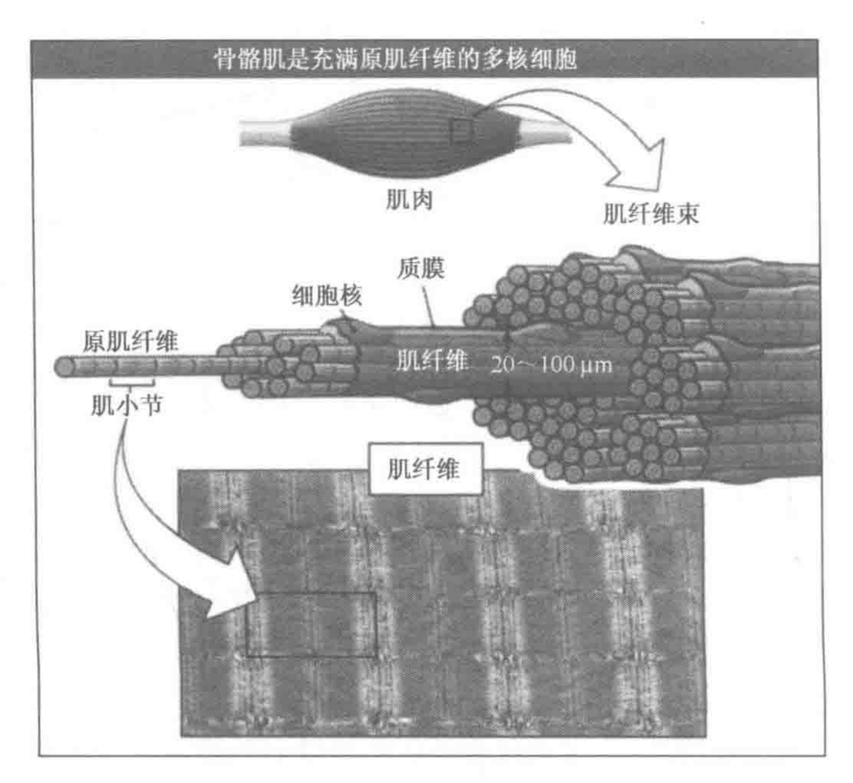


图 8.38　骨骼肌包括肌纤维细胞，肌纤维细胞含有沿细胞纵向的肌原纤维。肌原纤维是收缩装置，它们含有被称作肌小节的重复单位。照片由 Pennsylvania 大学医学院的 Clara Franzini-Armstrong 惠赠。

肌小节是横纹肌收缩的基本单位，其长度在肌肉收缩和放松之间不停变化。肌小节含有粗肌丝，粗肌丝主要由两极肌球蛋白Ⅱ纤维以及含有肌动蛋白纤维和肌动蛋白调控蛋白的细肌丝组成，如图 8.39 所示。肌动蛋白纤维的倒刺端锚定在肌小节的一个被称作 Z 盘的结构上，因此所有的肌动蛋白纤维在有 Z 盘的一面都具有相同的极性。肌动蛋白纤维被锚定在 Z 盘上并且被结合的加帽蛋白（CapZ）加帽，这阻止了肌动蛋白纤维的解聚。肌动蛋白纤维的尖端朝向肌小节的中心并且被原肌球调节蛋白加帽。伴肌动蛋白也与肌动蛋白纤维相互作用，它可能调控细肌丝的装配和长度。

粗肌丝集中于 M 带的 Z 盘间。M 带是由双极粗肌丝之间的柔韧连接结构所组成的，这些连接使得粗肌丝排列形成六角形。另外，粗丝连接蛋白-巨大纤维状蛋白，在 Z 盘和肌球蛋白纤维之间形成弹性连接。粗丝连接蛋白保持粗肌丝集中在肌小节中，并起着弹簧的作用以防肌小节过度拉伸。

粗肌丝和细肌丝在一个精密的三维网格中犬牙交错。肌小节是极性的，以便肌球蛋白马达相对于肌动蛋白的定向在两半边是相同的。在收缩时，粗肌丝的肌球蛋白马达结构域伸向细肌丝并与肌动蛋白相互作用，如图 8.40 所示。收缩通过粗肌丝和细肌丝之间的相对滑动，拉动 Z 盘朝向肌小节的中心来缩短肌小节。在肌球蛋白头部向着肌动纤维倒刺端运动时，粗肌丝和细肌丝本身的长度维持不变。在脊椎动物中，放松的肌小节在肌肉中的宽度为 3 μm，而在收缩时则缩短至约 2.4 μm。

肌纤维中数以千计的肌小节缩短，使整个肌肉缩短。有两个因子决定肌纤维缩短的

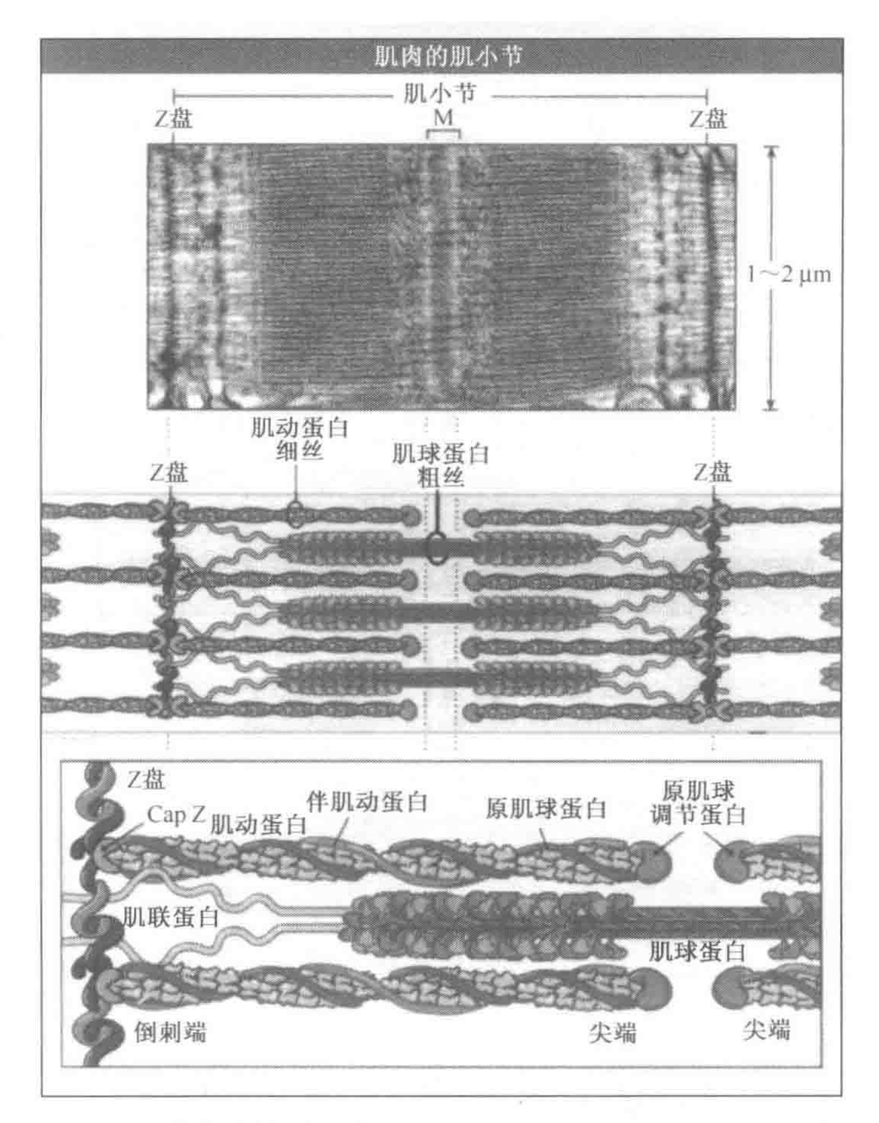


图 8.39　每一个肌小节的末端是 Z 盘，它通过 CapZ（加帽蛋白）与肌动蛋白纤维连接。肌球蛋白粗肌丝与 Z 盘通过肌联蛋白连接并在肌动蛋白纤维间犬牙交错。半肌动蛋白从 Z 盘延伸到原肌球调节蛋白。然而，它是如何与肌动蛋白结合的细节还不是很清楚。照片由 Pennsylvania 大学医学院的 Clara Franzini-Armstrong 惠赠。

总长度：每一个肌小节缩短的长度以及串联的肌小节的数量，如图 8.41 所示。如果不考虑纤维的长度，肌纤维的收缩百分比是相同的。

肌小节产生的总力是与相互作用的肌动蛋白-肌球蛋白在半边肌小节中的数量成正比的，而肌纤维能够产生的总力与平行的肌小节的数量成比例。因此，举重者通过增加恒截面积来使肌肉变强壮，而不是增加长度。

横纹肌的收缩受到与细肌丝的肌动蛋白结合的肌钙蛋白-原肌球蛋白复合体的调控，如图 8.42 所示。原肌球蛋白分子是一条长 40nm 的二重螺旋（coiled-coil）多肽，沿着肌动蛋白螺旋纤维首尾相接地盘绕。肌钙蛋白是由三个不同的蛋白质组成的复合体：肌钙蛋白 C、肌钙蛋白 I 和肌钙蛋白 T。肌钙蛋白复合体与原肌球蛋白结合，因此肌钙蛋白在细肌丝上间隔 40nm。

在低钙浓度下，原肌球蛋白以空间阻断的形式封闭肌动蛋白上的肌球蛋白结合位点，因此肌肉处于放松状态，肌球蛋白的 ATP 水解速率也非常低。放松的肌小节可以被顺从地伸展，几乎没有来自于肌动蛋白-肌球蛋白相互作用的阻力。

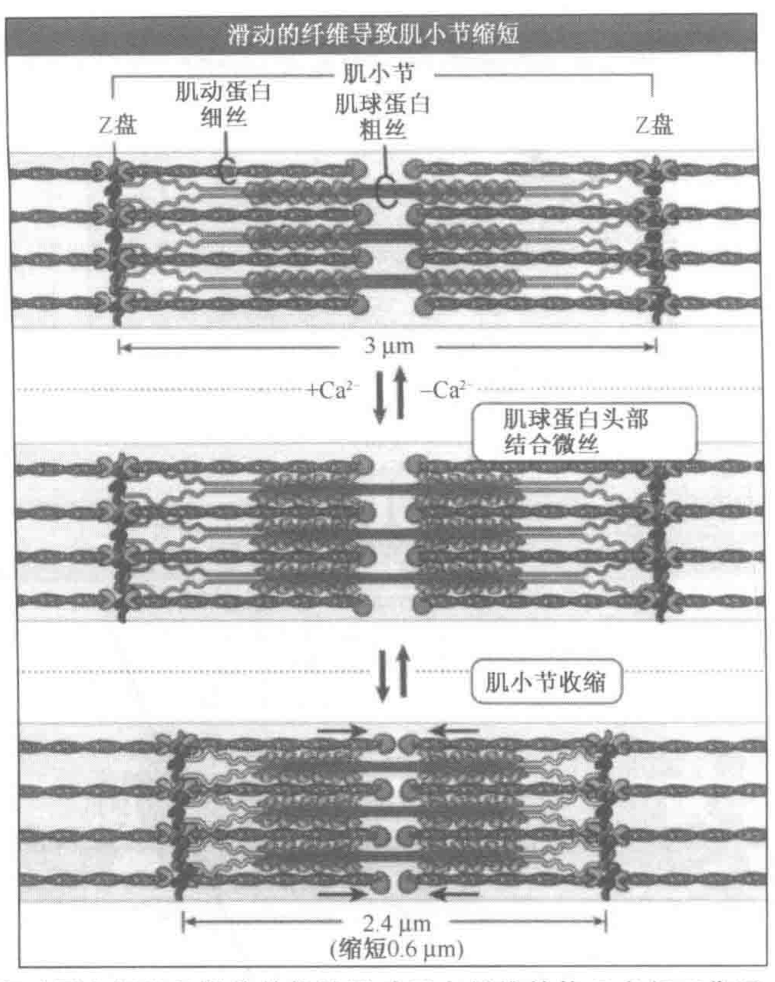


图 8.40 肌球蛋白粗肌丝附着并拉扯肌动蛋白纤维并使 Z 盘相互靠近，由此缩短肌小节的长度，同时发生肌肉收缩。

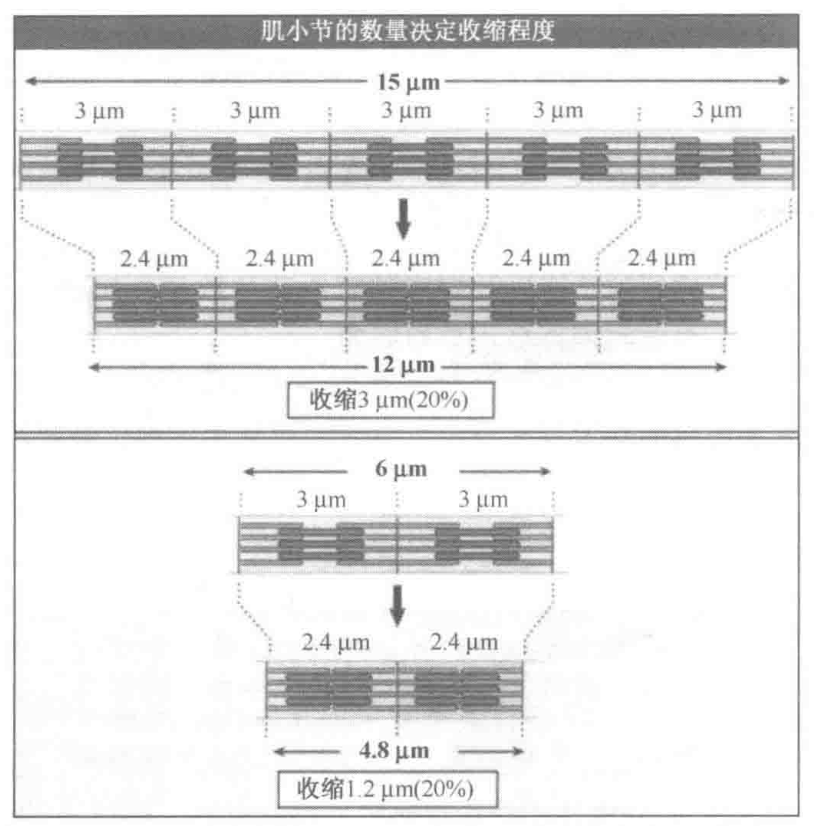


图 8.41 肌原纤维越长（换句话说，肌小节越多），收缩时肌原纤维减少的长度就越多。然而，减少的百分比与肌小节的数量无关。

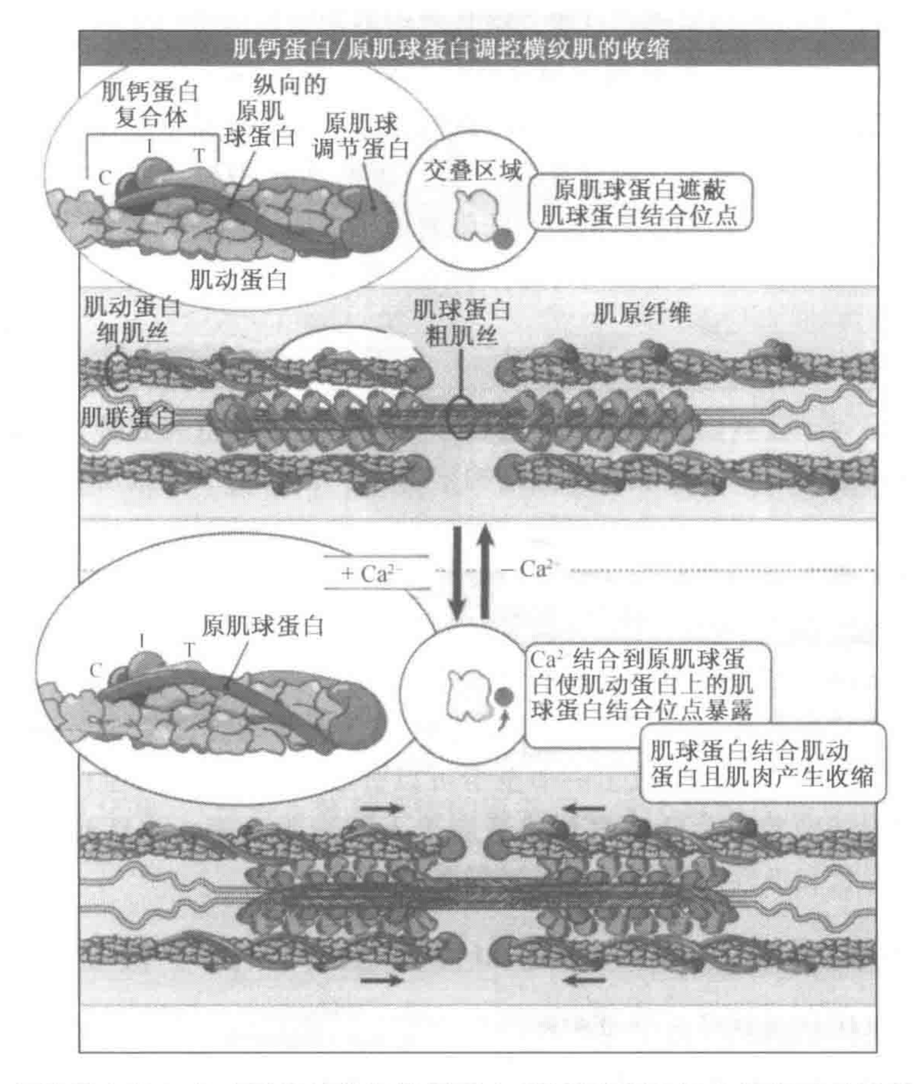


图 8.42 细胞质中的 Ca^{2+} 水平通过控制肌钙蛋白/原肌球蛋白复合体相对于肌球蛋白和肌动蛋白的位置来调控横纹肌的收缩。

神经脉冲引起钙从肌质网（一个肌肉中储存钙的细胞器）释放到胞质中，钙浓度升高，钙与肌钙蛋白 C 结合，肌钙蛋白构象改变，进而导致原肌球蛋白从肌动蛋白的肌球蛋白结合位点上移开，如此肌球蛋白就能够与肌动蛋白相互作用并通过它的机械化学循环产生力（如图 8.32）（肌质网和钙释放的细节见 3.24ER 按其形态和功能可以再进行细分和 2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。

8.22 展望

在确定机制以及控制肌动蛋白聚合方面已经取得了巨大的进步。然而，在不同的信号转导途径是如何使肌动蛋白骨架组装成特定的功能结构方面还有很长的路要走。例如，形成丝足需要哪些成核、加帽以及交联蛋白？构成一个收缩环需要哪些蛋白质？

三种细胞骨架纤维网络（微丝、微管和中间纤维）广泛地相互作用。例如，某些移动的囊泡和细胞器可以沿着肌动蛋白纤维和微管移动，微管马达结合并运输中间纤维，并且发现肌球蛋白马达及肌动蛋白结合蛋白与微管结合蛋白处于同一复合体中。研究人员正在确定细胞骨架网络是如何相互作用的，以及这些相互作用的细胞功能。

关于大部分肌球蛋白超级家族成员的分子功能也有许多需要继续研究的。我们知道肌

球蛋白超级家族的成员参与了哪些过程，但是我们不知道单体蛋白在这些过程中的分子功能是什么。令人感兴趣的问题包括：为什么信号转导蛋白需要马达结构域（肌球蛋白Ⅱ、Ⅺ和ⅩⅥ）？像肌球蛋白Ⅰ和Ⅵ一样的肌球蛋白在内吞作用和膜运输中的作用是什么？肌球蛋白在调控富含肌动蛋白的突出（肌球蛋白Ⅰ、Ⅵ、Ⅶ和ⅩⅤ）中扮演着何种角色？研究人员正在继续研究肌球蛋白生化的、结构的和细胞的性质从而确定它们的分子功能。

8.23 总结

微丝骨架是一种机械支持，它使细胞能够动态地维持其特定的形状、迁移和重置其内部结构及细胞器。这些动态的特点是通过肌动蛋白纤维的组装和解聚来调节的，肌动蛋白纤维是由肌动蛋白单体组成的极性结构聚合体。在细胞中，肌动蛋白单体组装成纤维，以及纤维解聚成单体，是由一群肌动蛋白结合蛋白严格调控的。

肌动蛋白结合蛋白调控新生肌动蛋白纤维的聚合，阻止肌动蛋白单体的聚合，控制纤维长度，并且交联肌动蛋白纤维。信号转导通路与肌动蛋白结合蛋白的相互作用为调控细胞骨架的动态和结构提供了一种机制。

肌球蛋白是利用水解 ATP 释放的能量做机械功的肌动蛋白结合蛋白。肌球蛋白存在于所有真核细胞中，并且组成了一个至少可以分成 18 类的大的蛋白质超家族。不同肌球蛋白亚型的结构和生化性质进化成适应于不同细胞功能，包括肌肉功能、细胞收缩、调节细胞形状和极性以及参与信号转导途径。

8.24 补充：聚合物的装配是如何产生力的两个模型

肌动蛋白单体加入到纤维中是怎样产生力来驱动膜突出的？已经提出了两种“布郎刺轮（Brownian rathet）模型”来描述肌动蛋白的聚合是如何产生力并转移微粒或界面的。这两个模型都需要某些成分（肌动蛋白纤维或者被移动的微粒）来经历偶然的热（布朗）运动，并且需要肌动蛋白单体的浓度高于临界浓度以使延伸可以发生。然而，这两个模型在扩散成分（肌动蛋白纤维或者微粒）上有所不同。

在第一个模型中，肌动蛋白纤维固定且足够硬，以致其不会弯曲，微粒（例如囊泡）或界面（例如迁移细胞前沿的质膜）由于布朗运动而在位置上振动，如图 8.43 所示。当纤维的倒刺端与膜联系时，由于自由的肌动蛋白单体不能够结合到倒刺端上，纤维的延伸被阻止。而当微粒或界面发生扩散时，它和纤维倒刺端之间将会出现空隙。当此空隙足够大时，单体将会加入到倒刺端，从而阻止微粒后退（图 8.43 中左图）。通过阻止向后的扩散、填充倒刺端和微粒之间形成的空隙，聚合校正微粒的扩散方向以使其向一定的方向移动（图 8.43 中的右图）。微粒移动的速度取决于微粒能够移动得多快和加入一个新的肌动蛋白单体的能力（这取决于肌动蛋白的浓度以及延伸可用空间的概率）；微粒移动得越快，倒刺端延伸得就越快，微粒向正确方向的移动也越快。

另一个模型则同时考虑经历布朗运动的纤维和微粒的能力。由于移动的程度与大小成反比（大分子移动慢于小分子），一个远大于肌动蛋白纤维的微粒可以被看作是相对静止的。整体的肌动蛋白纤维不会快速地运动，但是热能确实会导致它们弯曲。因此，纤维的弯曲可以在微粒和纤维之间打开一个空间，使得一个单体可以加入到倒刺端。弯曲的纤维受到弹力并想要伸直。这个弹力对微粒施加一个力，随着纤维的伸直将微粒移动。

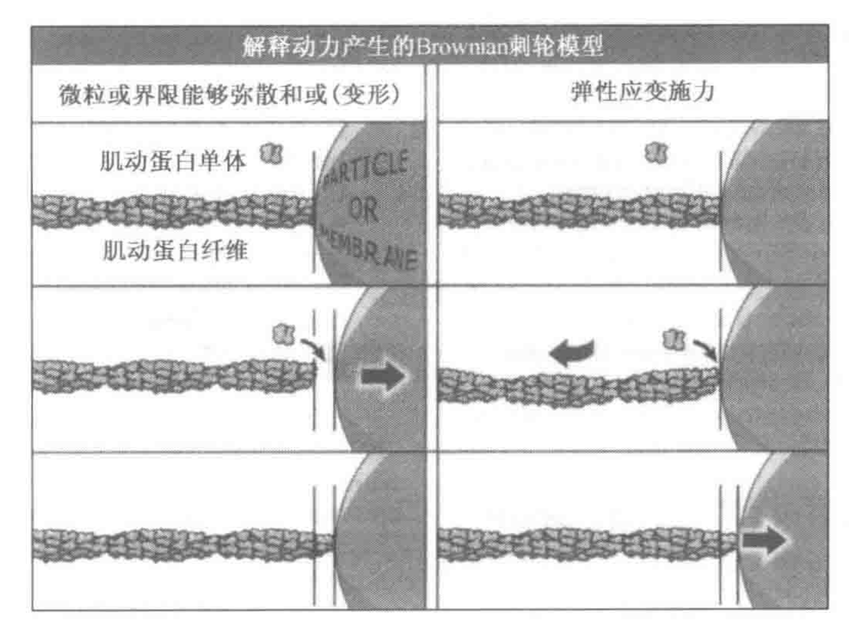


图 8.43 锚定在肌动蛋白纤维倒刺端的聚合是如何产生足够的力来驱动膜或者囊泡的两个模型。

力的产生来源于聚合反应，它不需要 ATP 水解的能量，但肌动蛋白亚基的再循环需要 ATP 的水解来使这个过程可以再次发生（见 8.13 肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白共同作用来驱动细胞迁移）。没有水解和单体的再循环，这个过程仅能发生一次。

参考文献

8.1 导言

综述

Bray, D., 2001. *Cell Movements: From Molecules to Motility*. New York: Garland.

Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J.C., 1999. *Actin*, 4th Edition. Oxford: Oxford University Press.

8.2 肌动蛋白是一种持续的泛表达细胞骨架蛋白

综述

Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J.C., 1999. *Actin*, 4th Edition. Oxford: Oxford University Press.

8.3 肌动蛋白单体与ATP和ADP结合

研究

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W., 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* v. 347 p. 44–49.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* v. 347 p. 37–44.

Tirion, M. M., and ben-Avraham, D., 1993. Normal mode analysis of G-actin. *J. Mol. Biol.* v. 230 p. 186–195.

8.4 肌动蛋白纤维是极性结构聚合物

综述

Oosawa, F., and Asakura, S., 1975. *Thermodynamics of polymerization of protein*. London: Academic Press.

研究

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W., 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* v. 347 p. 44–49.

Huxley, H. E., 1963. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* v. 16 p. 281–308.

Lorenz, M., Popp, D., and Holmes, K. C., 1993. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* v. 234 p. 826–836.

Wegner, A., 1976. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* v. 108 p. 139–150.

8.5 肌动蛋白的聚合是多步骤、动态的过程

综述

Frieden, C., 1985. Actin and tubulin polymerization: The use of kinetic methods to determine mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* v. 14 p. 189–210.

Oosawa, F., and Asakura, S., 1975. *Thermodynamics of polymerization of protein*. London: Academic Press.

研究

Pollard, T. D., 1986. Rate constants for the re-

actions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* v. 103 p. 2747–2754.
Pollard, T. D., and Mooseker, M. S., 1981. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* v. 88 p. 654–659.
Woodrum, D. T., Rich, S. A., and Pollard, T. D., 1975. Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. *J. Cell Biol.* v. 67 p. 231–237.

8.6 肌动蛋白亚基聚合之后水解ATP

综述

Mitchison, T. J., 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* v. 3 p. 1309–1315.

研究

Carlier, M. F., Pantaloni, D., Evans, J. A., Lambooy, P. K., Korn, E. D., and Webb, M. R., 1988. The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett.* v. 235 p. 211–214.
Carlier, M. F., and Pantaloni, D., 1986. Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry* v. 25 p. 7789–7792.
Combeau, C., and Carlier, M. F., 1988. Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF-3 and A1F-4. *J. Biol. Chem.* v. 263 p. 17429–17436.
Cooke, R., 1975. The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. *Biochemistry* v. 14 p. 3250–3256.
Pollard, T. D., 1984. Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Biol.* v. 99 p. 769–777.
Pollard, T. D., and Mooseker, M. S., 1981. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* v. 88 p. 654–659.
Pollard, T. D., and Weeds, A. G., 1984. The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett.* v. 170 p. 94–98.
Wegner, A., 1976. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* v. 108 p. 139–150.

8.7 肌动蛋白结合蛋白调控肌动蛋白的聚合和组装

综述

dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., and Nosworthy, N. J., 2003. Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* v. 83 p. 433–473.
Zigmond, S. H., 2004. Beginning and ending an actin filament: Control at the barbed end. *Curr. Top. Dev. Biol.* v. 63 p. 145–188.

8.8 肌动蛋白单体结合蛋白影响聚合

研究

Mockrin, S. C., and Korn, E. D., 1980. *Acanthamoeba* profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* v. 19 p. 5359–5362.
Safer, D., Elzinga, M., and Nachmias, V. T., 1991. Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* v. 266 p. 4029–4032.
Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., and Lindberg, U., 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* v. 365 p. 810–816.
Tilney, L. G., Bonder, E. M., Coluccio, L. M., and Mooseker, M. S., 1983. Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: A behavior regulated by profilin. *J. Cell Biol.* v. 97 p. 112–124.

8.9 成核蛋白控制细胞肌动蛋白的聚合

综述

Pollard, T. D., and Borisy, G. G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* v. 112 p. 453–465.
Vartiainen, M. K., and Machesky, L. M., 2004. The WASP-Arp2/3 pathway: Genetic insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 174–181.
Zigmond, S. H., 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 99–105.

研究

Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D., 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* v. 127 p. 107–115.
Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., and Pollard, T. D., 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3

complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 96 p. 3739–3744.

Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., and Pollard, T. D., 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* v. 294 p. 1679–1684.

8.10 加帽蛋白调控肌动蛋白纤维的长度

综述

Fischer, R. S., and Fowler, V. M., 2003. Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.* v. 13 p. 593–601.

Wear, M. A., and Cooper, J. A., 2004. Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem. Sci.* v. 29 p. 418–428.

Yin, H. L., and Janmey, P. A., 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* v. 65 p. 761–789.

Zigmond, S. H., 2004. Beginning and ending an actin filament: Control at the barbed end. *Curr. Top. Dev. Biol.* v. 63 p. 145–188.

8.11 剪切及解聚蛋白调控肌动蛋白纤维的动态

综述

Bamburg, J. R., 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: Essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 185–230.

研究

Galkin, V. E., Orlova, A., VanLoock, M. S., Shvetsov, A., Reisler, E., and Egelman, E. H., 2003. ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J. Cell Biol.* v. 163 p. 1057–1066.

McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A., 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* v. 138 p. 771–781.

8.12 交联蛋白组装肌动蛋白纤维束和正交网络

综述

Kreis, T., and Vale, R., 1999. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford: Oxford University Press.

8.13 肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白共同作用来驱动细胞迁移

综述

Bray, D., 2001. *Cell Movements: From Molecules to Motility*. New York: Garland.

Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 29 p. 545–576.

Pollard, T. D., and Borisy, G. G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* v. 112 p. 453–465.

Rafelski, S. M. and Theriot, J. A., 2004. Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* v. 73 p. 209–239.

研究

Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F., 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* v. 401 p. 613–616.

Svitkina, T. M., and Borisy, G. G., 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* v. 145 p. 1009–1026.

Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G., and Portnoy, D. A., 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* v. 357 p. 257–260.

Theriot, J. A., and Mitchison, T. J., 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* v. 352 p. 126–131.

Wang, Y. L., 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.* v. 101 p. 597–602.

8.14 小G蛋白调控肌动蛋白聚合

综述

Raftopoulou, M., and Hall, A., 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* v. 265 p. 23–32.

8.15 肌球蛋白是基于肌动蛋白的分子马达并在许多细胞过程中起着必要的作用

综述

Balasubramanian, M. K., Bi, E., and Glotzer, M., 2004. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr. Biol.* v. 14 p. R806–R818.

Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E., 2001. A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* v. 12 p. 780–794.

De La Cruz, E. M., and Ostap, E. M., 2004. Relating biochemistry and function in the

myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 61–67.

Hasson, T., 2003. Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J. Cell Sci.* v. 116 p. 3453–3461.

Hirokawa, N., and Takemura, R., 2003. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* v. 28 p. 558–565.

Howard, J., 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Kreis, T., and Vale, R., 1999. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford: Oxford University Press.

Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F., 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* v. 84 p. 359–369.

Sellers, J., 1999. *Myosins*, 2nd Edition. Oxford: Oxford University Press.

Sokac, A. M., and Bement, W. M., 2000. Regulation and expression of metazoan unconventional myosins. *Int. Rev. Cytol.* v. 200 p. 197–304.

Soldati, T., 2003. Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a ménage à trois? *Traffic* v. 4 p. 358–366.

研究

Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A., 1995. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat. Genet.* v. 11 p. 369–375.

Holt, J. R., Gillespie, S. K., Provance, D. W., Shah, K., Shokat, K. M., Corey, D. P., Mercer, J. A., and Gillespie, P. G., 2002. A chemical-genetic strategy implicates myosin-1c in adaptation by hair cells. *Cell* v. 108 p. 371–381.

Lee, S. J., and Montell, C., 2004. Light-dependent translocation of visual arrestin regulated by the NINAC myosin III. *Neuron* v. 43 p. 95–103.

Liang, Y., et al., 1999. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* v. 61 p. 243–258.

Müller, R. T., Honnert, U., Reinhard, J., and Bähler, M., 1997. The rat myosin myr 5 is a GTPase-activating protein for Rho in vivo: essential role of arginine 1695. *Mol. Biol. Cell* v. 8 p. 2039–2053.

Novak, K. D., Peterson, M. D., Reedy, M. C., and Titus, M. A., 1995. Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J. Cell Biol.* v. 131 p. 1205–1221.

Patel, K. G., Liu, C., Cameron, P. L., and Cameron, R. S., 2001. Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1alpha and 1gamma1. *J. Neurosci.* v. 21 p. 7954–7968.

Richards, T. A., and Cavalier-Smith, T., 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* v. 436 p. 1113–1118.

Tuxworth, R. I., Weber, I., Wessels, D., Addicks, G. C., Soll, D. R., Gerisch, G., and Titus, M. A., 2001. A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr. Biol.* v. 11 p. 318–329.

Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., and Weston, M. D., 1995. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* v. 374 p. 60–61.

Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., and Hammer, J. A., 1997. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: Evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Sci.* v. 110 (Pt 7) p. 847–859.

8.16 肌球蛋白具有三个结构域

综述

Geeves, M. A., and Holmes, K. C., 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* v. 68 p. 687–728.

Holmes, K. C., and Geeves, M. A., 2000. The structural basis of muscle contraction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 355 p. 419–431.

Krendel, M., and Mooseker, M. S., 2005. Myosins: Tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* v. 20 p. 239–251.

Warshaw, D. M., 2004. Lever arms and necks: A common mechanistic theme across the myosin superfamily. *J. Muscle Res. Cell Motil.* v. 25 p. 467–474.

研究

Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J., and Vale, R. D., 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* v. 380 p. 550–555.

Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C., and Milligan, R. A., 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* v. 261 p. 58–65.

Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. N., Winkelmann, D. A.,

Wesenberg, G., and Holden, H. M. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* v. 261 p. 50–58.
Toyoshima, Y. Y., Toyoshima, C., and Spudich, J. A., 1989. Bidirectional movement of actin filaments along tracks of myosin heads. *Nature* v. 341 p. 154–156.
Warshaw, D. M., Guilford, W. H., Freyzon, Y., Krementsova, E., Palmiter, K. A., Tyska, M. J., Baker, J. E., and Trybus, K. M., 2000. The light chain binding domain of expressed smooth muscle heavy meromyosin acts as a mechanical lever. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 37167–37172.

8.17 肌球蛋白水解ATP是多级反应

综述

De La Cruz, E. M., and Ostap, E. M., 2004. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 61–67.
Geeves, M. A., and Holmes, K. C., 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* v. 68 p. 687–728.
Vale, R. D., and Milligan, R. A., 2000. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* v. 288 p. 88–95.

研究

Lymn, R. W., and Taylor, E. W., 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* v. 10 p. 4617–4624.

8.18 肌球蛋白马达具有适于其细胞功能的动力学特征

综述

De La Cruz, E. M., and Ostap, E. M., 2004. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 61–67.

研究

Sellers, J. R., and Veigel, C., 2006. Walking with myosin v. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 18 p. 68–73.

8.19 肌球蛋白产生纳米级的移动和皮牛顿级的力

综述

Guilford, W. H., and Warshaw, D. M., 1998. The molecular mechanics of smooth muscle myosin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* v. 119 p. 451–458.
Howard, J., 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
Warshaw, D. M., 2004. Lever arms and necks: a common mechanistic theme across the superfamily. *J. Muscle Res. Cell Motil.* v. 25 p. 467–474.

研究

Finer, J. T., Simmons, R. M., and Spudich, J. A., 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* v. 368 p. 113–119.
Warshaw, D. M., Guilford, W. H., Freyzon, Y., Krementsova, E., Palmiter, K. A., Tyska, M. J., Baker, J. E., and Trybus, K. M., 2000. The light chain binding domain of expressed smooth muscle heavy meromyosin acts as a mechanical lever. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 37167–37172.

8.20 肌球蛋白受多重机制调控

综述

Bähler, M., and Rhoads, A., 2002. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* v. 513 p. 107–113.
Matsumura, F., 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol.* v. 15 p. 371–377.
Somlyo, A. P., and Somlyo, A. V., 2003. Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* v. 83 p. 1325–1358.

研究

Adelstein, R. S., and Conti, M. A., 1975. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature* v. 256 p. 597–598.
Karcher, R. L., Roland, J. T., Zappacosta, F., Huddleston, M. J., Annan, R. S., Carr, S. A., and Gelfand, V. I., 2001. Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Science* v. 293 p. 1317–1320.
Wang, F., Thirumurugan, K., Stafford, W. F., Hammer, J. A., Knight, P. J., and Sellers, J. R., 2004. Regulated conformation of myosin V. *J. Biol. Chem.* v. 279 p. 2333–2336.
Wendt, T., Taylor, D., Messier, T., Trybus, K. M., and Taylor, K. A., 1999. Visualization of head-head interactions in the inhibited state of smooth muscle myosin. *J. Cell Biol.* v. 147 p. 1385–1390.
Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., and Hammer, J. A., 1997. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: Evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Sci.* v. 110 (Pt 7) p. 847–859.

8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能

综述

Bagshaw, C. R., 1992. *Muscle Contraction*, 2nd Edition. London: Chapman and Hall.

Engel, A. G., and Franzini-Armstrong, C., 2004. *Myology*. New York: McGraw-Hill.

8.24 补充：聚合物的装配是如何产生力的两个模型

研究

Peskin, C. S., Odell, G. M., and Oster, G. F., 1993. Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys. J.* v. 65 p. 316–324.

赵和平　译

第9章　中间纤维

E. Birgitte Lane
Centre for Molecular Medicine，Singapore

本章概要

9.1　导言

关键概念

- 中间纤维是细胞核和细胞质骨架的主要成分。
- 中间纤维对于组织维持正确的结构和功能是必不可少的。
- 中间纤维的直径介于肌动蛋白纤维和微管之间，形成坚固的网状结构。
- 中间纤维是由蛋白亚基构成的聚合体。
- 中间纤维蛋白基因超家族的同源性低且庞大复杂。
- 超过50种人类疾病与中间纤维的突变有关。

微管、肌动蛋白纤维（微丝）以及**中间纤维**组成了细胞骨架的三种主要的丝状蛋白系统。如图9.1所示，中间纤维在细胞质和细胞核中均形成网络，并且存在于几乎所有后生生物（动物）细胞中。即使是体外的单个细胞的存活也依赖于微管和肌动蛋白纤维，而中间纤维则不同于此，它在组织水平发挥着无可替代的作用，即其是组织和器官正确行使功能所必需的。某些种类的中间纤维与细胞锚定连接有关，这对于组织的形成是非常重要的。

包括多个亚家族的庞大基因家族编码中间纤维蛋白。这些蛋白构成了复杂的丝状体

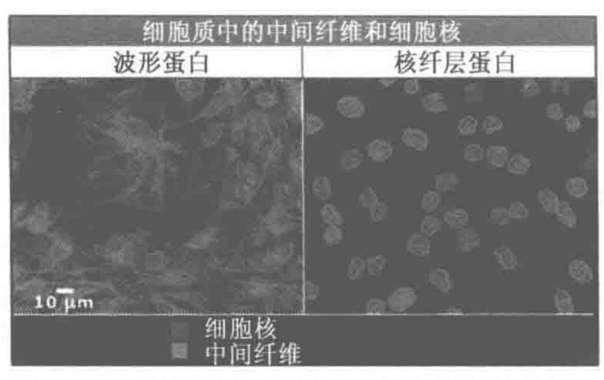


图 9.1 不同种类中间纤维在培养的纤维原细胞中的分布：免疫荧光显微标记的波形蛋白和核纤层蛋白。波形蛋白定位在细胞质中，而核纤层蛋白 B 定位在细胞核中。图片由新加坡分子医学中心的 John Common 和 Birgit Lane 惠赠。

系，在标准的生理状态下，这些丝状体系可占细胞蛋白质总量的 80%。中间纤维的亚细胞分布与微管和肌动蛋白质纤维不同。早在 20 世纪 60 年代，肌肉组织中的单个纤维在电镜下被观察到之前，组织学家就发现了它们的存在，例如神经中的神经元纤维和上皮中的张力纤维。在肌肉细胞中，“中间”纤维的直径介于“粗丝”（肌球蛋白Ⅱ）和“细丝”（肌动蛋白）之间。中间纤维的平均直径是 10nm，大于肌动蛋白纤维（~8nm），小于微管（~25nm）。这三个体系如图 9.2 所示。

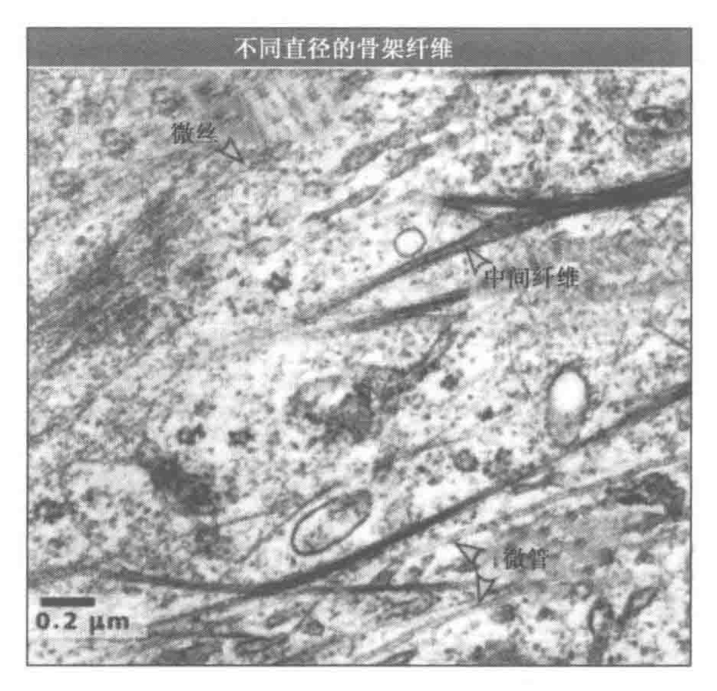


图 9.2 透射电镜观察到的细胞骨架主要成分。肾脏表皮细胞的薄切面所示为肌动蛋白微纤维、中间纤维 K8/K18，以及微管。图片经许可复制自 Leigh，I. M.，et al. The Keratinocyte Handbook. Copyright © Cambridge University Press 1994。图片由 Dundee 大学生命科学学院的 Birgit Lane 惠赠。

所有的中间纤维蛋白都具有相似的分子结构，组装成的纤维具有很高的强度，电镜下的形态也很相似。该蛋白家族在高等脊椎动物中是最为复杂的，这也是本章的焦点。在无脊椎动物中也确定无疑存在中间纤维。但是无脊椎动物中的中间纤维蛋白基因远远少于脊椎动物。另外，无脊椎动物的中间纤维的异质性和组织特异性更低。在人类基因组中共有 70 个中间纤维基因，如果算上个别基因的不同拼接，人类中间纤维蛋白的类型大约为 75 个。无论是与肌动蛋白还是微管蛋白相比，中间纤维都具有更显著的多样性和异质性。所有的中间纤维蛋白都表现出组织特异性和分化特异性。

人们对于大部分关于中间纤维的表达和其生化特性的了解，要早于对中间纤维功能的重视和其与疾病的联系的认识。中间纤维基因的突变与许多种类繁多、表型各异的遗传性失调有关，从皮肤脆性疱疹（fragile blistering skin）到早衰，总共有至少 50 多种不同的临床症状。几乎每一类中间纤维基因不是与这种就是与那种器官衰弱紊乱有关。这强烈地

意味着活的有机体内维持正常的物理恢复力对于组织的功能是十分重要的，显而易见，中间纤维直接地或间接地关联到与恢复力有关的某个关键因素。此外，中间纤维基因的表达是有高度组织特异性的，并且很有可能正是所有的这些蛋白质差异才使得不同组织的细胞特性表现出精巧的差异。组织中的细胞对不同的机械特性的要求——如刚性、弹性或代偿系统的聚合和解聚的速度等——可能正是进化出如此繁多的不同中间纤维基因的原因。

9.2 六类中间纤维蛋白结构相似但表达不同

关键概念

- 中间纤维蛋白均具有相似的结构——中间为 α 螺旋的延伸杆状结构域。
- 依据家族序列的同源性，中间纤维可被分为六类。
- 不同种类的中间纤维具有不同的组织表达模式。
- 单个中间纤维的抗体是检测细胞分化和病理研究的重要工具。

基于 DNA 和蛋白质序列的同源性，中间纤维家族的蛋白质可以被分成六类。这种分类部分地预言了它们的组织表达特异性。所有的中间纤维蛋白具有相似的结构，并且遵循相同的组装原则，而且都装配成直径大约 10nm 的纤维（就像我们在电镜下看到的那样）。如图 9.3 所示，中间纤维蛋白为长线状分子，包含一个伸展的 α 螺旋杆状结构

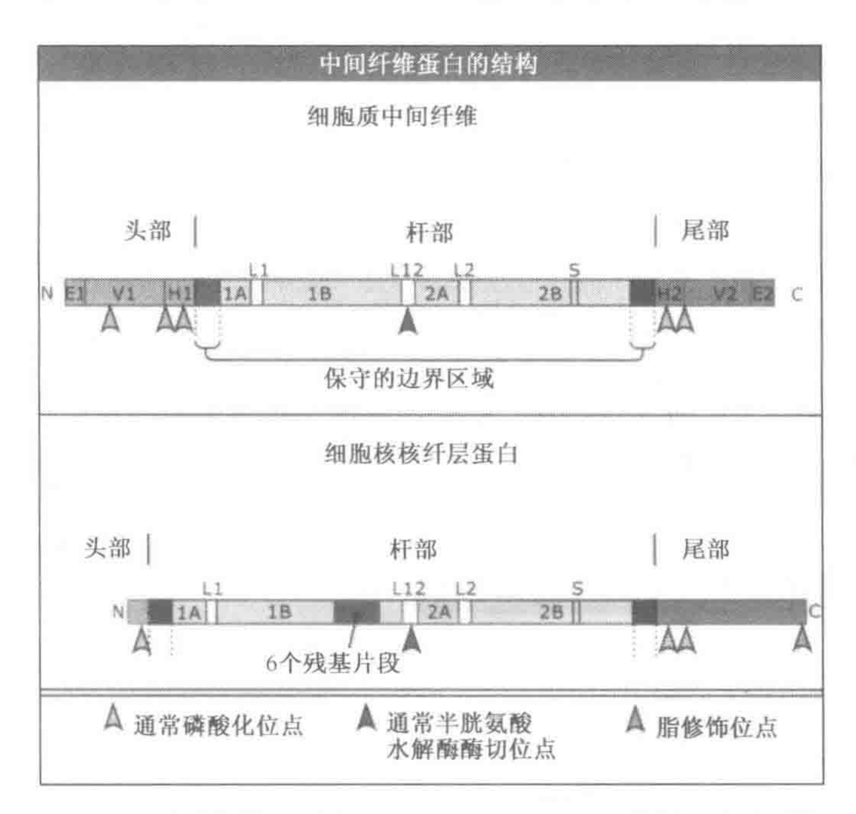


图 9.3 根据原始氨基酸序列数据预测的人类中间纤维蛋白的大致结构。所有中间纤维蛋白都有一个位于中间的杆状结构域和与它相连的头部和尾部结构域。这个大致的结构模型反映的结构最好地描述了Ⅱ型、Ⅲ型和Ⅵ型蛋白，而Ⅰ型蛋白缺少 H1 和 H2 区域，Ⅴ型蛋白缺少 E/V 结构域。对于脊椎动物和无脊椎动物的核纤层蛋白，使核纤层蛋白杆状结构域长度增加的额外氨基酸的位置也在图中标出。箭头所指为磷酸化的通常位点（一些中间纤维蛋白具有另外的磷酸化位点）、半胱氨酸水解的通常位点，以及核纤层蛋白的脂肪修饰的通常位点。

域，其两端与非 α 螺旋的头部和尾部结构域相连。杆状结构域具有四个 α 螺旋片段（1A、1B、2A 和 2B），由“连接臂”（L1、L12、L2）隔开，从其一级序列预测这些“连接臂”是非螺旋的。杆状结构域的长度在所有哺乳动物的细胞质中间纤维中是保守的（约 310 个氨基酸），略短于细胞核中间纤维的核纤层蛋白的杆状结构域（约 350 个氨基酸）。大部分中间纤维蛋白的分子质量为 40～70kDa。

两个高度保守的序列小段界定了杆状结构域的两端（如图 9.3 所示）。杆状结构域 C 端的约 12 个氨基酸残基组成了螺旋的终止部分，它们通常是 Glu-Ile-Ala-Thr-Tyr-Arg-（X）-Leu-Leu-Glu-Gly-Glu（X 可以是任意的氨基酸），它们是所有中间纤维蛋白都具有的特征序列。杆部 N 端的螺旋起始部分的序列则略有变化。这两个螺旋的边界序列的保守性对于其功能是非常重要的，许多实验得到的证据表明它们是纤维的末端对末端的互相连接的对接点。该结构域的突变会导致高度混乱和严重的疾病（见 9.4 角蛋白的突变导致上皮细胞变脆）。杆部还有另外两个高度保守的序列特点，一个是 2B 螺旋有一个所谓“口吃”（stutter）的不规则区（图 9.3 中的 S），另一个是沿着 α 螺旋的表面有一些正或负带电交替的氨基酸簇，每 9.5 个残基重复一次，这在纤维的装配过程中的杆状结构域侧面的相互连接中起着非常重要的作用（见 9.8 中间纤维亚基以高亲和力组装为抗张力结构）。

与杆部结构域相比，N 端的头部结构域和 C 端的尾部结构域无论是其长度还是其氨基酸序列都有着更大变化。每个末端结构域通常有三个可辨的亚结构域：一个高度带电的极性末端结构域（E1 或 E2），一个富含甘氨酸和丝氨酸的零散重复的可变区域（头部为 V1，尾部为 V2），以及一个高度可变区域（H1 或 H2）（如图 9.3）。许多中间纤维蛋白的末端结构域都含有对于纤维组装和解聚非常重要的磷酸化位点。头部和尾部的三级结构还不是完全清楚，但是它们的构象可能会随着蛋白质的组装而改变。头部结构域对于纤维的组装是必需的，而尾部结构域的作用还不太清楚，这是因为许多中间纤维本就没有尾部区域。

如图 9.4 所示，基于 DNA、氨基酸序列以及基因结构的相似性，中间纤维超家族的 6 个同源序列型以Ⅰ～Ⅵ进行命名。首先阐明的中间纤维蛋白序列是“Ⅰ型”和“Ⅱ型”羊毛角蛋白的毛发结构角蛋白。图 9.5 和图 9.6 列出了属于Ⅰ型和Ⅱ型两组的蛋白成员。

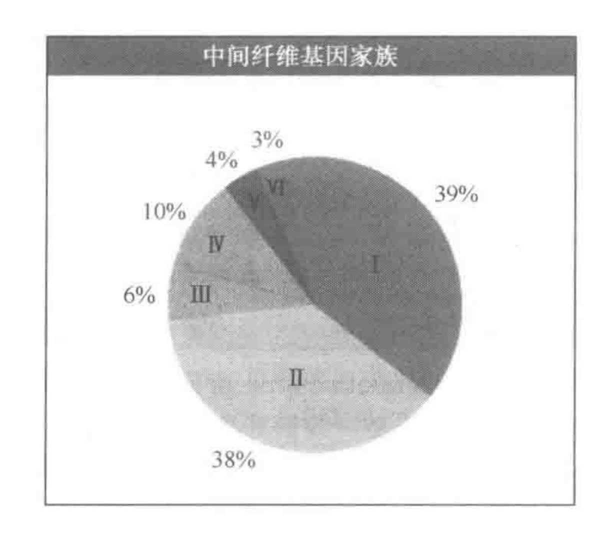


图 9.4　依据序列的相似性，中间纤维基因可以分成六个不同的组。Ⅰ型和Ⅱ型基因占中间纤维基因的大部分（如百分数所示）。

人类Ⅰ型中间纤维蛋白（Ⅰ型角蛋白）		
蛋白质 （旧名）	组织分化程序 （以正常组织举例）	确定的组装伴侣 （或预测的）
K18 K20	简单表皮：全部（肠膜）简单表皮：某些胃肠（小肠）	K8，K7 K8，(K7)
K9	分层表皮、基底层；上皮（手掌、脚掌）	(K1)
K10	分层表皮，基底层；上皮（表皮）	K1
K12	分层表皮：非上皮（口腔）	K3
K13	分层表皮：基底层、非上皮（口腔）	K4
K14	分层及复杂上皮：基细胞；全部（表皮）	K5
K15	分层表皮：某些基细胞（上皮）	(K5)
K16	分层上皮：基底层；压力，快速翻转（口腔）	K6a
K17	分层表皮：压力，快速翻转（深层毛囊）	K6b
K19	分层表皮：基细胞；某些简单上皮（乳腺）	K8
K23	表皮（未定位）	
K24	表皮（未定位）	
K25 (K25irs1) K26 (K25irs2) K27 (K25irs3) K28 (K25irs4)	结构表皮细胞：附属组成表皮（内部毛囊）	
K31 (Ha1) K32 (Ha2) K33a (Ha3-Ⅰ) K33b (Ha3-Ⅱ) K34 (Ha4) K35 (Ha5) K36 (Ha6) K37 (Ha7) K38 (Ha8) K39 K40	结构表皮细胞：坚硬结构和附属物（毛发、指甲、舌头）	Ⅱ型线泡角蛋白

图 9.5　属于Ⅰ型序列同源性组（Ⅰ型角蛋白）的人类中间纤维蛋白。这些蛋白分为简单角蛋白（简单表皮细胞）、屏障角蛋白（在分层鳞片表皮和复杂表皮中），以及与附肢表皮相关的两类结构角蛋白。

属于同一组的基因之间的序列同源性大部分都在60%左右，有的会超过95%；但是两个不同组之间的基因序列同源性则降低到20%。同组内的杆状结构域序列同源性通常都很高，尤其是螺旋边界的序列。头部和尾部结构域则更多变，并且常常具有相似表达范围的纤维之间的相似性比在同一组内之间的更高。末端结构域的结构也有很大的差异：Ⅰ型角蛋白有很短的甚至根本没有 H1 和 H2 结构域，并且Ⅳ型蛋白缺少明显可辨的 E1/V1 和 E2/V2 亚结构域。

这些同源序列型组与中间纤维蛋白组织表达的极高特异性及其进化史高度一致。Ⅰ型和Ⅱ型蛋白是在上皮细胞中表达的角蛋白，它们占据了70种人类中间纤维基因中的54种。Ⅲ型包括四个高度相关的蛋白，它们每一种都是细胞类型特异性的。Ⅳ型包括七

人类Ⅱ型中间纤维蛋白（Ⅱ型角蛋白）		
蛋白质 （旧名）	组织分化程序 （以正常组织举例）	确定的组装伴侣 （或预测的）
K7 K8	简单表皮：许多（乳腺） 简单表皮，全部（肠膜）	K18（K19） K18（K19，K20）
K1	分层表皮：基底层；上皮（表皮）	K10（K9）
K2（K2e）	分层表皮：基底层；上皮；晚期（表皮）	（K10）
K3	分层表皮：非上皮（角膜）	K12
K4	分层表皮：基底层；非上皮（口腔）	K13
K5	分层及复杂表皮：基细胞；全部（上皮）	K14（K15）
K6a	分层表皮：基底层；压力，快速翻转（口腔）	K16
K6b	分层表皮：压力，快速翻转（深层毛囊）	K17
K6c（K6e/h）	表皮（未定位）	
K75（K6hf）	分层表皮（毛囊鞘）	（K16，K17）
K76（K2p）	分层表皮：基底层；上皮（腭）	（K10）
K77（K1b）	表皮（汗腺）	
K78（K5b）	表皮（未定位）	
K79（K61）	表皮（未定位）	
K80（Kb20）	表皮（未定位）	
K71（K6irs1） K72（K6irs2） K73（K6irs3） K74（K6irs4）	结构表皮细胞：附属组成表白（内部毛囊）	
K81（Hb1） K82（Hb2） K83（Hb3） K84（Hb4） K85（Hb5） K86（Hb5）	结构表皮细胞：坚硬组织和附属物（毛发、指甲、舌头）	Ⅰ型线泡角蛋白

图 9.6　属于Ⅱ型序列同源性组（Ⅱ型角蛋白）的人类中间纤维蛋白。这些蛋白可以被分成简单角蛋白（简单上皮细胞）、屏障角蛋白（在分层鳞片表皮和复杂表皮中），以及与表皮附属物相关的两类结构角蛋白。

个神经纤维表达的蛋白。Ⅴ型蛋白是普遍存在于细胞核中的核纤层蛋白，它是在进化上最为古老的一类中间纤维基因。Ⅵ型包括与其他类型不相适应的两组不同的眼球晶体的纤维蛋白。

在每组成员的个体间也发现有组织特异性（如图 9.5、图 9.6、图 9.12；不同类型的上皮细胞的细节见 9.3 Ⅰ型和Ⅱ型角蛋白是两类最大的中间纤维）。另外，一些中间纤维蛋白在炎症胁迫或创伤时也会表达。中间纤维可能是最有效的组织以及细胞分化的标志物。由于中间纤维的组织表达特异性，在发育和分化过程中，甚至是转移的瘤都可以通过它来进行追踪，因而从细胞生物学到病理学，中间纤维的抗体都被广泛地用来鉴别细胞以及组织的分化。不正常的分化可以通过对中间纤维的表达来进行监测，而不正常的分化通常是严重病理变化的早期线索。组织特异性是中间纤维的最显著特点，在中间纤维与疾病的大量联系建立之前，相对于其他所有的特点，组织特异性是最初吸引研

究注意力于这些主要结构蛋白的主要因素。

9.3 Ⅰ型和Ⅱ型角蛋白是两组最大的中间纤维

关键概念

- 哺乳动物中大部分中间纤维是角蛋白。
- 角蛋白是Ⅰ型和Ⅱ型蛋白的专一异质多聚物。
- 成对的角蛋白的表达是上皮细胞分化和增生的前兆。
- 简单角蛋白 K8 和 K18 是特化最少的角蛋白。
- 在所有中间纤维中，屏障角蛋白最为复杂，表达最多变。
- 硬附属物的结构角蛋白明显区别于其他的角蛋白，它可能是在哺乳动物的进化中最晚出现的角蛋白。

人类中间纤维基因的大部分编码角蛋白：如图 9.5 和图 9.6 所示，共有 28 种Ⅰ型角蛋白和 26 种Ⅱ型角蛋白。角蛋白有时也称为胞质角蛋白，在上皮细胞中以Ⅰ型/Ⅱ型对的形式共同表达。角蛋白是上皮组织的非常基本的特点，以至于可以用它的存在与否来判定上皮组织。不表达角蛋白的片层组织（sheet tissue）（例如血管内皮）就没有被划分到上皮组织。角蛋白纤维与细胞间的锚定连接（桥粒）和细胞与基质间的连接（半桥粒）有关，这些连接和角蛋白纤维一起形成了跨组织的结构网络，这特异地出现在分层上皮中，如表皮（这些连接的细节见第 15 章细胞外基质和细胞粘连）。上皮片层组织主要的角蛋白按照电荷量和分子质量从最大的、最基本的蛋白 K1（Ⅱ型组）到 K19（最小的酸性Ⅰ型蛋白）进行归类。

如图 9.7 所示，每一个Ⅰ型角蛋白都与一个特定的Ⅱ型角蛋白相伴表达，并且每一角蛋白对都是特定的，可以预示特定类型的上皮细胞的分化及特化。尽管在体外，一种类型的任一角蛋白可以和多种互补类型的角蛋白形成纤维，但是在体内，它们的聚合表现出更多的选择性，只与特定的或偏好的角蛋白配对。这些角蛋白对的表达与上皮分化的特定通路紧密相关，或者甚至就是通路的一阶，角蛋白对中一个成员的出现几乎总是伴随着另一个的出现（如图 9.8 所示）。从功能上来看，角蛋白对可以分成至少三类：简单角蛋白、屏障角蛋白以及结构角蛋白。

角蛋白在上皮细胞中表达。上皮是组织整合的典型，在这里，细胞整齐地排列成一层或者多层。上皮细胞标明了器官的界限以及吸收和分泌渠道的边界。正如图 9.8 所示，它们通常是含有一层细胞的**单层上皮**，细胞直接与下部的特异细胞外基质层（基层）相接触，并且有直接与管腔或肠腔相对的自由表面。另一方面，多层的或者**层积上皮**构成了身体主要的物理屏障组织，从覆盖身体外表面的表皮到与体孔和排泄孔周围外部区域相关的特化上皮表面。层积上皮的细胞经常被称为角质细胞。层积上皮组织也是诸如腺体、毛发、尾巴等特化的复杂上皮的原始器官，它们可能包含有简单上皮结构的结构域。当发育完全以后，层积屏障上皮的外层细胞会变平或者成为鳞片状。层积鳞片上皮通常有 6～10 层细胞厚，并且一直覆盖在表面以保护身体免受物理的、化学的以及致癌物质的伤害。

上皮细胞由细胞间的桥粒及细胞与基质间的半桥粒一起连接在浆膜上，每个细胞的

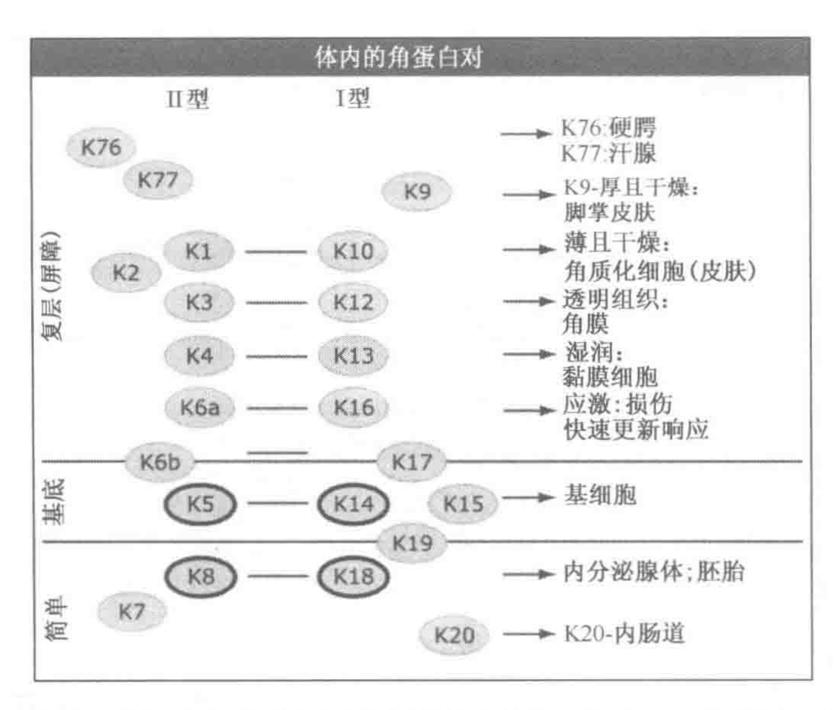


图 9.7 角蛋白以 I 型/II 型蛋白对的组织特异形式表达。每种角蛋白的表达都代表了某种特定类型上皮的分化特点。粗线圈的部分表示初级角蛋白。

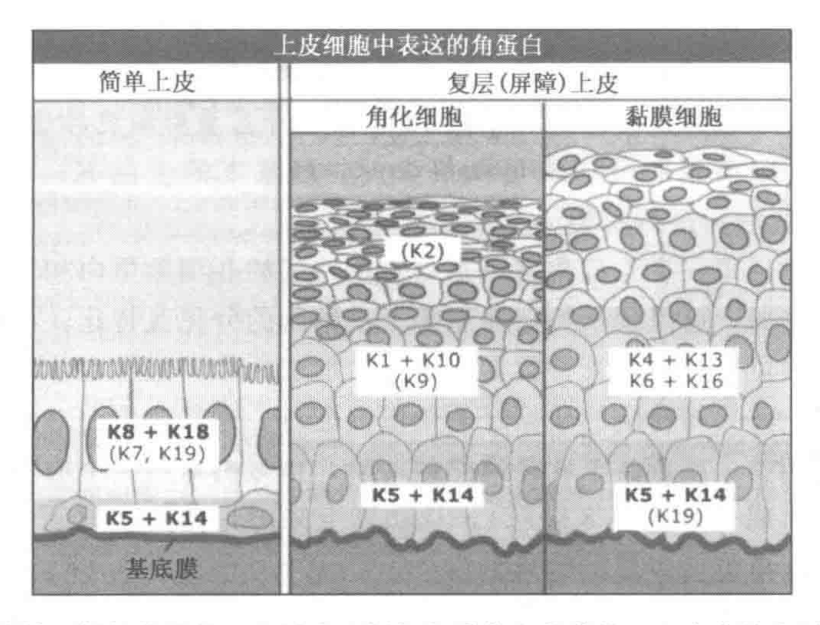


图 9.8 在简单（例如分泌的）和屏障（例如角质化和黏膜的）上皮中的主要上皮角蛋白的顺续表达。主要的角蛋白用粗线标出。可变的或次要的角蛋白未显示。角蛋白的表达是与细胞在组织中的位置有关的，因此也与它的增殖状态有关：与基膜失去联系使其离开细胞周期并进入分化。

桥粒和半桥粒都被横贯细胞质的密集的角蛋白纤维束网络连接在一起（见第 15 章细胞外基质和细胞粘连）。层积上皮的角质细胞表达的中间纤维蛋白无论是数量还是种类都比其他任何类型的细胞大得多，以此满足细胞对抗物理压力的需要。上皮细胞是否表达某种特异的角蛋白纤维蛋白取决于它所处的位置以及生理状态。这已得到层积上皮进一步分化过程中角蛋白表达量发生的变化的准确无误的证实。基细胞是层积上皮中的分化程度最低的细胞，它们仍然与基膜相连。这些细胞仍然可以分裂——其中一些会成为组

织干细胞而可能少有分裂，其他大部分会经历细胞分裂长成组织。一旦基细胞分裂，一个子细胞就会离开基隔进入第一上基底层。这一重要的过渡转移将细胞从基膜的直接影响及由它提供的生长信号的影响下移走，细胞将会进行终端分化。然后它就开始了它前往上皮的旅程。这是最后的分化过程，在此过程中，细胞最终将会死亡并从组织中脱落。角蛋白表达的程序化的改变是与某些上皮细胞离开增殖域转入分化相关联的（如图9.8所示）。

在发育过程中首先表达的角蛋白是简单角蛋白组。其中，最基本的或最普遍的是K8（Ⅱ型）和K18（Ⅰ型）。它们出现在最早的胚胎细胞中，可能是在进化上最为古老的角蛋白。二者的表达代表着角蛋白表达的分化极弱的状态，即具功能的上皮组织，确切地说，是一层紧密连接的具极性的细胞。在脊椎动物中K8和K18是分布最广的保守角蛋白，从卵母细胞到成年组织的整个发育过程都有其踪影。所有的胚胎细胞都表达K8和K18，直到原肠胚形成，当外胚层已分化成中胚层时，二者停止表达，Ⅲ型波形蛋白开始表达。

K8和K18在胚胎上皮细胞中持续表达，直到细胞开始进入特定形态发生通路，此时细胞转换表达更多的组织特异中间纤维蛋白。成年个体中，K8和K18是像腺体、肺、呼吸上皮组织以及胃肠等具有分泌和吸收功能的简单上皮细胞的特征物质（图9.9）。K8和K18在多种癌细胞中均有表达，其抗体已广泛应用于病理诊断。除这两种角蛋白外，至少还有两种其他的简单角蛋白，它们是K7（与K8相似，大部分分布在腺体管中）和K20（与K18相似，分布于部分胃肠中）。

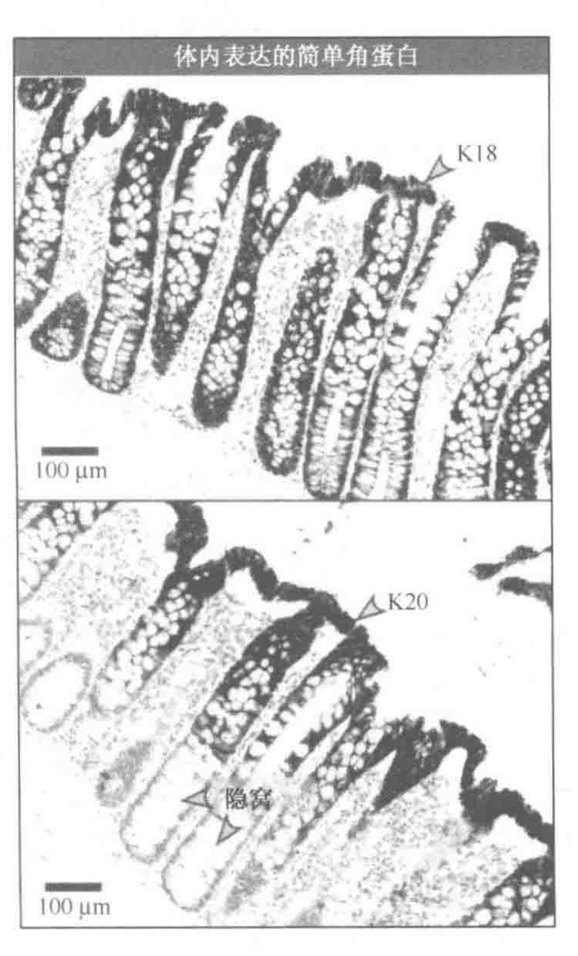


图9.9 免疫组化对大肠上皮内层的简单角蛋白的检测。两种Ⅰ型角蛋白K18和K20的定位是由通过两种连接有免疫过氧化物酶的特异单克隆抗体来标记染色的。角蛋白被染成棕色，并使用蓝色苏木精复染。基本角蛋白K18存在于所有的简单上皮中，而K20则只特异性地存在于某些分化的肠胃细胞中，这里可以看到，当细胞从腺窝底部向上移动时，它们被限制在日益增多的分化表皮的后部。照片由Dundee大学生命科学学院的Declan Lunny和Birgit Lane惠赠。

屏障角蛋白是层积上皮的特征物质。在这些角蛋白中，最重要的或者说最基本的角蛋白是K14（Ⅰ型）和K5（Ⅱ型），它们出现在如皮肤上皮等层积鳞片状上皮的基层角质细胞中。这些表达K5/K14的单层基层细胞是分化最低的组织区域，保留了增殖能力。在复杂腺体上皮中，在表达K8/K18的简单上皮细胞旁边的基层细胞被发现也表达K5/K14（图9.8）。在某些组织中，基层增殖细胞可以表达一些其他的角蛋白，例如K19、K15和K6/K17。

当细胞离开基层时，K5/K14的合成停止，转而合成次级或者说特异分化的角蛋白对（图9.8）。如图9.10（见图版）所示，在表皮中，该角蛋白对为Ⅱ型角蛋白K1和Ⅰ型角蛋白K10。基底上层细胞层的次级角蛋白表达与组织类型有关（图9.7和图9.8）。一些角蛋白，包括K6同型体、K16和K17，在表皮中起应激蛋白的作用，创伤及发炎时能快速诱导其表达。其他的组织则组成型表达这类“应激”蛋白，它们诱导产生的刺激对这些组织来说是固有的。

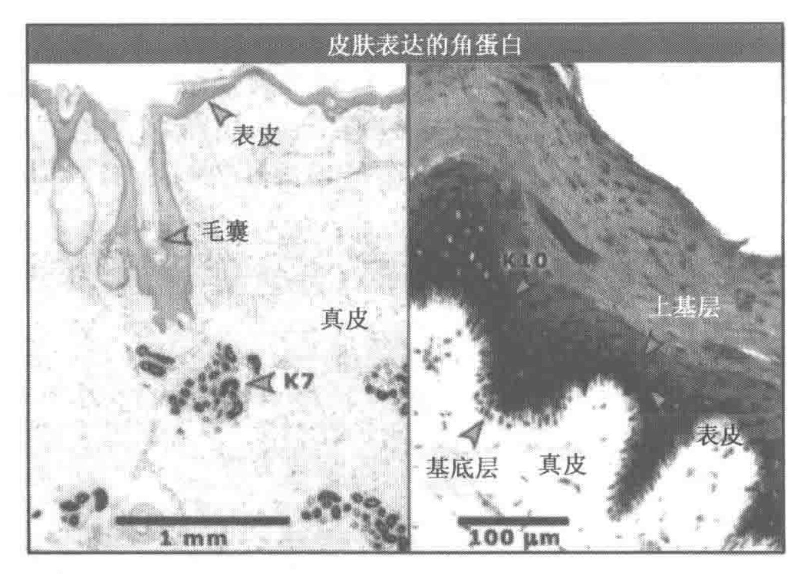


图9.10 皮肤组织特异性的角蛋白表达。左图：组织切片由Ⅱ型简单角蛋白K7的抗体染色，只有汗腺的分泌细胞（深棕色，使用直接免疫过氧化物酶染色）被明显着色。表皮的层积鳞片屏障上皮不能被抗体识别，只被苏木精复染成浅蓝色。右图：使用抗K10抗体染色的较厚的表皮切片，K10是在角状屏障组织的有丝分裂期后的基底上层细胞中表达的Ⅰ型次级或组织特异角蛋白。基细胞层没有被抗体染色，核被复染成蓝色。照片由Dundee大学生命科学学院的Declan Lunny和Birgit Lane惠赠。

因此，多层屏障上皮中的增生区域（基细胞层）与分化区域（基底上层）具有不同的角蛋白合成系统。屏障组织中的细胞脱离细胞周期是与初级角蛋白合成的停止和次级分化特异性角蛋白合成的开始紧密相关的。基底上层角蛋白特化以便为大的组织提供弹性，而一些次级角蛋白的表达可阻止有丝分裂的细胞分离，因此可能与增殖过程互不相容。

第三种“结构”角蛋白包括为数众多的中间纤维蛋白，它们仅在特化的坚硬结构及其周围和毛发、指甲等附属物中表达（图9.5和图9.6）。这些是毛发细胞或者丝胞的角蛋白，由上皮细胞制造的特化角蛋白产生毛发结构。这两种结构角蛋白的序列类型不同，是脊椎动物在最近的进化中所获得的。

毛囊中的结构角蛋白的顺续表达已经研究得十分清楚。第一组结构角蛋白在毛囊内

根鞘的中心上皮管的细胞层中是选择性表达的。管状结构非常牢固，是发轴形成的基准。第二组属于坚硬角蛋白（丝胞或头发），在发轴本身、指甲、舌头表面突起中的一些坚硬细胞（在猫的舌头中尤为明显）中表达，也有少量在胸腺中表达。这些丝胞角蛋白的头部和尾部结构域中半胱氨酸和脯氨酸残基的含量很高，这使得它们能够在分化变硬的毛发细胞的细胞质中与角蛋白结合蛋白——非丝状毛发蛋白形成二硫键，这些二硫键导致非常坚固的结构，从而形成附属物的坚硬组织。

9.4 角蛋白的突变导致上皮细胞的脆化

关键概念

- K5 和 K14 的突变会导致皮肤疱疹混乱病——单纯大疱性表皮松解。
- EBS 的剧烈突变导致非丝状角蛋白的组装。
- 其他角蛋白基因的结构相似的突变引起有着多种不同临床表现的组织脆化失调。
- 细胞的脆化失调证明角蛋白中间纤维起着加固组织的功能。

早在 20 世纪 90 年代，我们对于中间纤维功能的理解就取得了巨大的突破。人们发现，当 K5 或 K14 这两个在表皮基底层细胞中表达的角蛋白中的任何一个发生了突变，都会导致一种罕见的遗传性皮肤疱疹混乱病——单纯大疱性表皮松解（EBS）。三个相互补充的线索将角蛋白的突变与 EBS 联系起来：

- 重组表达角蛋白突变基因的小鼠的皮肤变化与 EBS 相似，
- 有 EBS 病史家族的遗传连锁分析发现了 K14 的突变，
- 以及 EBS 病人皮肤细胞中蛋白的组装与有丝分裂中角蛋白的瞬时组装相似，并且发现 K5 在免疫化学和 DNA 序列上都有缺陷。

EBS 病人的皮肤非常脆弱，他们无法忍受日常的刺激，如搔抓、摩擦甚至是行走。病人的皮肤受到物理刺激，基底细胞就会破裂，液体在基底膜和完整的上皮细胞层之间产生，导致充液皮肤水疱，如图 9.11 所示。这些上皮内的水疱变大并蔓延直到破裂，但是它们通常会在没有结痂的情况下痊愈。

EBS 的临床恶化表现多种多样，这取决于变异的类型。最严重的情况是由角蛋白的螺旋边界突变所致，并严重影响丝状组装，即使轻微的搔抓或摩擦皮肤都会导致蔓延的水疱（图 9.3 和图 9.15）。通常，只在手和脚这些受冲击大的部位产生水疱的较轻症状是杆状结构域或非螺旋区域的其他位置突变所致，在这些位置氨基酸序列的变化可能并不是很危急。大部分与疾病相关的角蛋白的突变是显性的，这就意味着只要两个基因拷贝中的任何一个有缺陷都会导致疾病的发生：就像链子中间的虚弱连接，当有缺陷的环节散布于聚合纤维中时就会降低其强度。因此，EBS 仅通过一个有缺陷的基因拷贝（来自于父母中的任意一方）就可以遗传传递下去。然而，也有少数隐性的 EBS 记录，两个基因拷贝都有缺陷。这通常是 K14 的无效突变所致，当病人的 K14 基因的两个拷贝都是无效突变时就会发病，但是，值得注意的是，如果根本没有 K14 的话反而免于发病。研究 K5 和 K14 的突变与 EBS 之间的联系对于理解中间纤维的功能是十分重要的，因为很明显角蛋白丝对于组织中上皮细胞的物理加固是非常重要的。当中间纤维网络的完整性受到破坏时，细胞就会变得脆弱，轻微的物理损伤都会使其崩溃。



图 9.11　图中所示为单纯大疱性表皮松解病（EBS）的情况，它是与中间纤维基因突变相关的一种失调症，是由角蛋白 K5 和 K14 的突变引起的。大图所示为由于搔抓、摩擦或过紧的衣服所造成的皮肤水疱的特征。小图所示为用橡皮擦摩擦皮肤表面后所取的活体皮肤切片：表皮角化细胞的基层中有一个由于细胞裂开所造成的充满液体的水疱。照片由 St. Thomas' 医院 St. John's 皮肤医学研究所的 Robin A. Eady 惠赠。

在已知的角蛋白表达模式基础上，通过对许多其他的皮肤脆化情形进行分析，发现至少 19 种角蛋白基因的突变与至少 25 种临床上截然不同的失调相关。不同角蛋白导致的失调的临床表现多种多样，这取决于突变所危害到的细胞的类型。例如，K1 和 K10 的突变会导致所有基底上层角质形成细胞层的脆化，但是次级的、晚表达的角蛋白 K2 的突变会导致更加表面的、更加扁平的水疱的发生。包括 K9（特异性地存在于手掌和脚掌）和 K16 的一些角蛋白的突变，会导致手掌和脚掌皮肤的剧烈加厚。口腔和生殖器表皮的基底上层细胞的脆化是由于 K4 或 K13 的突变和 K16 或 K6a 的突变造成的。其他的角蛋白的失调从指甲的加厚到角膜表面的水疱有着多种多样的表型。

相对于初级角蛋白 K5 和 K14 广范围的突变，分化特异性角蛋白基因的致病突变绝大部分发生在高度保守的螺旋边界序列中，所有角蛋白中发生在此的突变都会是破坏性的。在次级角蛋白的失调中，与造成温和 EBS 的突变所等价的突变是罕见的，尽管它们必然一定会发生在种群中，这暗示了发生在次级角蛋白的突变的影响被削弱了。最可能的解释是持续地来自基细胞的残余的 K5/K14 纤维加固了基底上层角蛋白角质化细胞。形态学相关的皮肤脆化失调也可以由角蛋白相关蛋白的突变所导致，比如网蛋白或者桥粒和半桥粒连接的蛋白（见 9.10 中间纤维的结合蛋白是偶发的而非必需的）。

简单上皮角蛋白 K8 和 K18 在所有脊椎动物中都是高度保守的，并且是正常发育必需的，但是这些角蛋白的突变对人类疾病的作用尚不清楚。在小鼠中，缺失 K8 是致命的，这是由于胎盘不足，而 K8 和 K18 能够保护细胞以抵抗各种冲击；在人类中可能也是相同的。K8 和 K18 的危害巨大的突变（在螺旋边界序列中）在人类中尚未发现，有可能是致命的；"轻微的"突变确实有所发生，可能是影响肝、胰腺、胃肠上皮的多因子失调的风险因子。这些可能是仅有的能与胚胎共存的有轻微缺陷的角蛋白，且可能本身不致病。

9.5 中间纤维在神经、肌肉以及结缔组织中经常表现为重叠表达

关键概念

- 某些Ⅲ型和Ⅳ型中间纤维蛋白的表达范围有重叠。
- 许多Ⅲ型和Ⅳ型蛋白可互相组装。
- 多种类型的中间纤维蛋白的共表达可消除一种蛋白的突变所造成的危害。
- 结蛋白是肌肉必需蛋白。
- 波形蛋白常在单细胞中表达
- Ⅲ型和Ⅳ型基因的突变常导致肌肉和神经退行性失调

图9.12列出了非角蛋白的中间纤维蛋白，Ⅲ～Ⅵ型。我们将会讨论属于Ⅲ型和Ⅳ型基因同源性组的中间纤维蛋白。Ⅲ型蛋白有结蛋白、波形蛋白和酸性神经胶质纤维蛋白(GFAP，图9.13)，分别在结缔组织细胞、肌肉细胞、神经细胞和其他已分化细胞中表达。它们各自被调控并与不同的分化通路紧密联系。一些蛋白具有表达范围的重叠，而一些Ⅲ型和Ⅳ型蛋白可以共组装，但不会和角蛋白（Ⅰ型和Ⅱ型）或者核纤层蛋白（Ⅴ型）共组装。同其他的中间纤维一样，目前尚不完全清楚这些蛋白间的序列差异与其在不同类型细胞中的特定功能之间的联系，尽管这些蛋白的突变很明显与组织的缺陷有关。

人类Ⅲ～Ⅵ型中间纤维蛋白			
	蛋白质	组织分化程序	组装伴侣（已知的）
Ⅲ型	波形蛋白	广泛分布	自身
	GFAP	Astroglial 细胞	自身
	结蛋白	所有肌肉细胞类型	自身
	外周蛋白	外周神经系统：某些CNS；受损轴突	自身，NF-L
Ⅳ型	NF-H	神经元	NF-L
	NF-M	神经元	NF-L
	NF-L	神经元	自身
	巢蛋白	广泛分布：神经上皮干细胞，神经胶质细胞，肌肉	Ⅲ型
	α-互联蛋白	神经元	自身
	Synemin α，Desmuslin/synemin β	肌肉细胞	Ⅲ型
	Syncoilin	肌肉细胞	Ⅲ、Ⅳ型
Ⅴ型	核纤层蛋白 A	细胞核：许多细胞类型，分化的	核纤层蛋白 A，C
	核纤层蛋白 C1，C2	细胞核：许多细胞类型，分化的	核纤层蛋白 A，C
	核纤层蛋白 B1	细胞核：许多细胞类型，很多分化的	核纤层蛋白 B
	核纤层蛋白 B2，B3	细胞核：来自早期发育	核纤层蛋白 B
Ⅵ型	Filensin/CP115	晶状体	CP49
	CP49/phakinin	晶状体	Filensin

图9.12 属于Ⅲ～Ⅵ型序列同源性组的人类中间纤维蛋白。

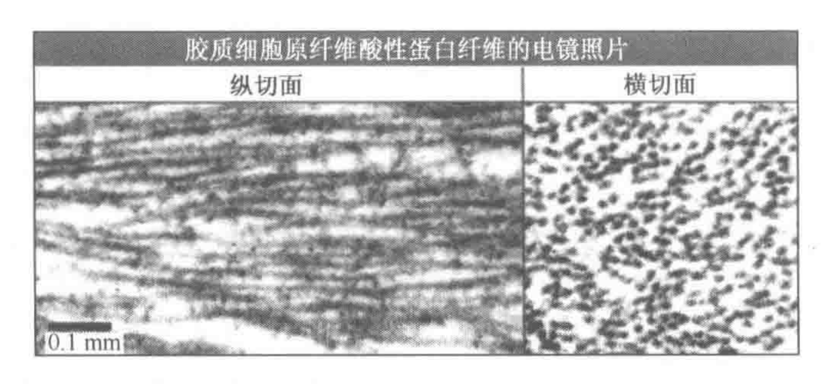


图 9.13 脊索星型细胞的酸性神经胶质纤维蛋白纤维的电镜观察。照片复制自 Eliasson, C., et al. *J. Biol. Chem.* 1999. 274：23996-24006. Copyright © 1999. by ASBMB. 照片由 Göteborg 大学 Sahlgrenska 研究院的 Milos Pekny 博士和 Claes-Henric Berthold 博士惠赠。

结蛋白对所有肌肉细胞（横纹肌、心肌以及平滑肌）都是必需的。像表皮中的角蛋白，结蛋白为组织细胞提供关键的物理恢复力。结蛋白纤维在伸缩结构（例如横纹肌的肌节）的锚定位点之间起作用，锚定位点是肌肉细胞中巨大的机械冲击着力点。这意味着结蛋白在肌肉细胞中扮演着抵抗机械冲击的角色，这已被突变或丢失结蛋白可致组织失去维持张力能力所证实。结蛋白与其他的Ⅲ型蛋白共组装；在某些细胞中，结蛋白也与Ⅳ型蛋白相互作用（肌肉收缩的细节见 8.21 肌球蛋白Ⅱ在肌肉收缩中的功能）。

与结蛋白不同，波形蛋白是在单细胞或松散连接的细胞团或细胞块中表达，而非致密组织，如肌肉和多数表皮。在发育过程中，波形蛋白在角蛋白之后表达，并且成年后仍在许多细胞中维持表达，如间叶细胞、结缔组织细胞，以及从纤维原细胞（图 9.1）到造血细胞、血管壁内皮细胞，还有某些上皮细胞。

星型胶质细胞和神经胶质细胞是神经系统中的非神经细胞，对于神经元的生长、分化以及再生是必需的。所有星型胶质细胞都表达 GFAP，GFAP 通常与结蛋白或Ⅳ蛋白巢蛋白一起表达。这种共表达能够保护细胞免受突变和基因缺失所造成的影响。在动物模型中所做的双敲除实验表明，Ⅲ型中间纤维是普通星型细胞参与中枢神经系统的外伤痊愈以及抵抗渗透压所必需的。星型细胞的正常功能需要经过一些细胞过程，当中间纤维缺失时这些过程就会出现缺陷。

外周蛋白主要在外周神经系统中表达。在轴突生长过程中，轴突首先表达外周蛋白和波形蛋白，之后被神经纤维三聚体蛋白（NF-L、NF-M 和 NF-H）取代。但是，当神经受到损伤时外周蛋白能够再次快速地表达。外周蛋白的量对其功能是至关重要的：在小鼠中，过多外周蛋白是致死的并会导致神经退行性现象，然而没有外周蛋白又会导致失去某些小的感觉轴突。

一般认为Ⅳ型序列同源性组包括大、中、小三种分子质量（NF-L、NF-M 和 NF-H）的神经纤维三聚蛋白复合体，以及 α 整联蛋白、巢蛋白、成束蛋白和联丝蛋白（sunemin）（图 9.12）。大部分Ⅳ型蛋白在组织中趋向于与别的类型蛋白组装，尤其是与Ⅲ型或Ⅳ型蛋白的组装更加有效。神经纤维三聚体蛋白在成熟的神经元中几乎总是同时表达，但是成束蛋白以及联丝蛋白的两个拼接类型（α 和 β）则更多地在肌肉细胞中表达并与Ⅲ型蛋白相互作用。与结蛋白类似，成束蛋白和联丝蛋白的免疫组化定位在肌肉细胞的着力点，表明这些中间纤维蛋白也具有抗冲击功能。

神经元轴突的极端长度（例如在人类坐骨神经中能够达到1m）强调了维持神经纤维充分表达对于加固细胞质的重要性。在发育期间，表达的神经纤维形成复杂、错列、顺序互迭的、一个蛋白叠到另一个之上的蛋白序列，并逐步前移以使神经组织持续表达中间纤维。巢蛋白与波形蛋白同时首先表达（与星型细胞中的GFAP相似，在受到外伤时神经中的巢蛋白再次表达），随着神经突触的延伸，α联丝蛋白的表达取代了巢蛋白和波形蛋白，其后是NF-L，最后是分子质量更高的神经纤维蛋白。神经纤维三聚体蛋白对于稳定伸长的轴突和突触是十分重要的。

一些Ⅳ型蛋白具有很长的尾部结构域，这些结构域具有组织细胞质形态的功能。NF-H的尾部结构域具有一系列Lys-Ser-Pro的重复序列，它们是丝氨酸磷酸化位点。当这些重复序列被磷酸化，尾部带电增强使纤维向右伸展，这样有助于拓展轴突细胞质的空间。在小鼠中，轴突的数量和直径与神经纤维的表达呈正相关。轴突直径越大，其电导率越高，这是脊椎动物向着更大体形进化的一个极其重要的特征。

通过对动物模型的研究发现，Ⅲ型基因突变与很多病理情况有关。人类GFAP突变与致命性神经退行性失调亚历山大病有关。动物实验表明当缺少GFAP时，星型胶质细胞对于损伤的反应不正常，并且细胞质突出不能延伸。许多结蛋白的致病性突变已得到总结，这些突变分散在整个蛋白结构中。人类结蛋白突变会造成心血管缺陷，尤其是由心肌扩张导致的心力衰竭，以及某些形式的肌肉细胞营养失调。缺少结蛋白的小鼠，主血管过于软化不能承受足够的血压，反过来又增加衰弱心脏的负担，于是导致心血管扩张。结蛋白肌病的肌肉细胞存在胞内结蛋白组装现象，类似于严重EBS病人的基层角质形成细胞中发现的角蛋白组装。缺少对结蛋白突变与疾病关系的了解可能意味着它是与其他纤维蛋白共表达的。

Ⅳ型神经纤维蛋白的突变几乎全部发生在头部和尾部结构域中，这些突变与神经退行性疾病肌萎缩侧索硬化症、进行性腓骨肌萎缩症1型以及2E型、帕金森症有关。神经元细胞质的长度使其易受伤害而导致官能障碍的途径多种多样，不仅限于物理脆化。神经纤维蛋白在胞体中合成然后由微管马达蛋白运输到轴突中。神经元纤维缠结，常作为神经退行的标志，它是神经纤维的胞体中的堆积物，但是还不清楚其因果关系：可能是其他扰乱轴突运输因子的衍生结果，例如微管功能故障。神经纤维突变的因果关系比角蛋白突变更难以确定。“角蛋白病”通常在出生或出生后不久就可以发现，但是大部分神经退行性混乱是迟发的，常常混淆遗传分析。

9.6 核纤层蛋白中间纤维强化核膜

关键概念

- 核纤层蛋白位于细胞核内，形成界定核膜的核纤层。
- 膜锚定位点是由转录后修饰的核纤层蛋白产生的。
- 在有丝分裂期间，通过被Cdk1磷酸化，核纤层蛋白解聚，从而使核膜解体。
- 核纤层蛋白基因的拼接可变。

Ⅴ型中间纤维组包括核纤层蛋白，核纤层蛋白在许多方面与脊椎动物细胞质中间纤维有着明显的不同：

• 它们是在核内的（图 9.1）；

• 它们经过选择性拼接；

• 它们经过修饰使得其能够结合在膜上；

• 它们的杆状结构域有一个特别长的螺旋 1B（图 9.3），这是一个与无脊椎动物中间纤维共有的结构；以及

• 它们有一种不同的纤维组装模式以及从不与其他非Ⅴ型中间纤维蛋白共组装。

核纤层蛋白沿着核膜内表面形成一个稳定的纤维网络结构，在这里，它们与许多特殊的蛋白质相互作用，包括核纤层蛋白相关蛋白以及核纤层蛋白 B 受体，来聚合、维持功能性的核环境。三个哺乳动物核纤层蛋白基因（*LMNA*、*LMNB1* 和 *LMNB2*）编码六种蛋白质：*LMNA* 基因通过三种方式选择性拼接 mRNA 得到核纤层蛋白 A、C1 和 C2 蛋白（统称为 A 型核纤层蛋白），*LMNB1* 编码核纤层蛋白 B1，核纤层蛋白 B2 的 mRNA 可以被拼接得到 B2 和 B3。B 型核纤层蛋白在早期胚胎前的所有类型细胞中表达，但是 A 型核纤层蛋白则被限制在较为分化的细胞类型中。例如，在皮肤的上皮中，基层角化细胞只表达核纤层蛋白 B2，它在分化的细胞中则由 A 型核纤层蛋白补充。C2 和 B3 核纤层蛋白以及它们在其他脊椎动物中的对应物仅在胚原细胞中表达。

核纤层纤维蛋白与细胞质中间纤维蛋白的结构明显不同，核纤层纤维的聚合方式也与细胞质中间纤维不同（见 9.8 中间纤维亚基以极高的亲和力组装成抗张力结构）。核纤层蛋白的螺旋 1 亚结构域包括六个七肽片段（共 42 个残基），而脊椎动物细胞质中间纤维则没有（图 9.3）。仅杆部亚结构域的尺寸差异就足以阻止核纤层蛋白与其他中间纤维蛋白共组装。有的无脊椎动物细胞质纤维蛋白的螺旋 1 也较长，这强烈表明长螺旋 1 是进化上很“古老”的特性。因此，猜测核纤层蛋白与进化的最古老形式的中间纤维有关。防止一段脆弱的 DNA 链不被破坏的机制也许是复杂有机体进化的一个必需的早期步骤。

有丝分裂时，哺乳动物细胞核膜消失，如图 9.14 所示，意味着核纤层必须解聚。在细胞分裂前期，核纤层蛋白的头部和尾部结构域（图 9.3）被有丝分裂激酶 Cdk1 磷酸化，促使核纤层蛋白解聚。尾部结构域同样有把核纤层蛋白特异地锚定在核上的序列（核定位信号），使其固定在核膜上（即通过膜锚定，但 A 型核纤层蛋白除外）。A 型和 B 型核纤层蛋白在有丝分裂中的表现有所不同：B 型核纤层蛋白与核膜囊泡碎片的联系贯穿有丝分裂，而 A 型核纤层蛋白则散布于细胞质中。有丝分裂末期核膜重新形成时，核纤层蛋白逐渐与凝集的染色质结合。通过尾部结构域的一个高度保守的位点脂化后修饰，B 型核纤层蛋白得以与核膜相互作用（图 9.3）。在 A 型核纤层蛋白中，该位点由 RNA 拼接或转录后酶切的形式去除。因此，大多数细胞只有 B 核纤层蛋白可以与核膜直接作用。然而，在精细胞中（精核），C2 核纤层蛋白的头部结构域有另一种膜锚定机制，使它能够与核膜结合（与核有关的细节见第 5 章细胞核结构与转运；与细胞有关的细节见第 10 章有丝分裂以及第 11 章细胞周期调控）。

了解核纤层蛋白突变的潜在致病机制仍然是一个挑战。A 型核纤层蛋白的突变与许多影响肌肉、神经和脂肪组织的遗传性失调有关。从家族性局部脂肪代谢障碍（身体某些区域的脂肪流失以及糖尿病）到各种严重的外周神经退化（2B1 型进行性腓骨肌萎

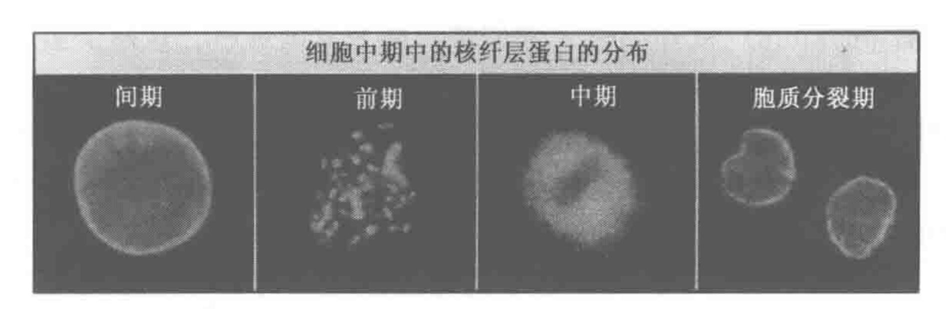


图 9.14　处于细胞周期进程阶段的纤维原细胞中的免疫荧光标记的核纤层蛋白 B。定位在核膜上的被染色的核纤层蛋白 B 在间期呈膜状，而在前期时核纤层蛋白片段被磷酸化。核纤层蛋白 B 在中期时是分散的，并在末期时随着染色质再组装起来，并在细胞质分裂时重新形成了位于子细胞核周围的核膜。照片由新加坡分子医学中心的 John Common 和 Birgit Lane 惠赠。

缩症），以及早衰症。在培养细胞中，破坏性的突变或消除核纤层蛋白会导致核膜不坚固，无法维持正常形状，表现为自动破裂和对机械冲击的不耐受。人类 B 型核纤层蛋白的突变尚未发现，其突变可能是致命的，因为 B 型核纤层蛋白在胚胎极早期的所有细胞中都表达。然而，表达缩短的核纤层蛋白 B1 的小鼠有许多发育缺陷，这些缺陷对新生鼠是致死的，使人联想到与 A 型核纤层蛋白突变相关的许多人类疾病。该鼠模型可能为了解人类疾病的机制带来一丝光亮。

有关蛋白质功能障碍的致病性的研究为生物学中蛋白质功能的理解提供了独特的信息，中间纤维理所当然地是其中一例。尽管我们不能说完全了解了疾病的机理，但角蛋白、结蛋白、GFAP 以及神经纤维的情况表明，疾病的临床表现和潜在的细胞脆化之间存在直接的联系。然而，随着对于各种各样的“核纤层蛋白病”的了解的增加，出现了一个问题：是否所有的失调真的只是直接或间接地由于细胞或组织机械恢复力的不足所引起的？在细胞水平上许多生理冲击当然可以转化成机械冲击，如化学压力导致渗透压上升。另外，核纤层蛋白病可能是组织在加速并有选择地清除受损细胞，其原初组织靶点由一些未知因子决定。这一领域还需要进行更多的研究。

9.7　各种晶状体纤维蛋白在进化上都具有保守性

关键概念

- 眼睛的晶状体含有两个不同寻常的中间纤维蛋白 CP49 和 filensin，它们组成了Ⅵ型序列同源性组。
- 这些不同寻常的中间纤维蛋白在脊椎动物的进化中是保守的。

脊椎动物眼睛晶状体细胞的特殊分化形式极度精确，如此组织才能正确行使功能。这些细胞必须：

- 有足够的刚性并有弹性，以使晶状体能够调节到不同的焦距；
- 尽量地透明以使光线能够不失真地通过；以及
- 在有机体的整个生命过程中维持这种状态。

晶状体细胞包括两个不同寻常的中间纤维蛋白，它们共组装形成“念珠状纤维”，这样叫的原因是它在电镜下呈波浪的外观（其他中间纤维的外观是光滑的）。这些蛋白

是 CP49（或者 phakinin）和 filensin，它们被归类为Ⅵ型蛋白。这两个蛋白拥有其他序列同源性组所共有的一些结构特征，但是它们却不会与任何其他类型的蛋白牢固结合。两者与其他中间纤维的最显著差异是 其“特征”氨基酸序列——螺旋终止序列。在 CP49 中，杆状结构域末端有 Tyr-His-Gly-Ile-Leu-Asp-Gly-Glu 序列，它取代了其他中间纤维蛋白中的高度保守序列 Tyr-Arg-Lys-Leu-Leu-Glu-Gly-Glu。

CP49 和 filensin 基因与身体中其他中间纤维的基因有所不同，其不同寻常的特性可能在眼睛晶状体中具有选择优势，因为在所有脊椎动物中同源的晶状体蛋白都是保守的。在进化上与哺乳动物完全不同的脊椎动物河豚（*Fugu ribripes*）的基因组中发现了一个 CP49/phakinin 序列。其保守性即使是在 CP49/phakinin 的螺旋末端基序的不寻常的序列中也是显著的。

晶状体细胞蛋白需要不同寻常的独特性质有许多原因。首先，它们使得眼睛晶状体细胞发育成为高度光学透明的。另外，因为晶状体是很长寿的，晶状体细胞的聚合体结构必须是生化性质异常稳定的，以避免蛋白质水解退化和随之而来的蛋白质构造的变化，这些变化会导致晶状体光学或物理学特性的改变从而使其失去功能。人们认为这些 CP49 和 filensin 的不同寻常的序列及形态发生的特点在一定程度上使得其满足了这些要求。改变晶状体纤维蛋白表达的动物模型的眼睛晶状体功能出现恶化，而 CP49 的显性突变可导致人类早发家族性白内障。

9.8 中间纤维亚基以高亲和力组装为抗张力结构

关键概念

- 在体外，中间纤维的组装是快速的并且不需要其他因子。
- 所有中间纤维蛋白的中心部分是一个可形成二聚物的长的 α 螺旋杆状结构域。
- 四聚体的反向平行组装决定了细胞质中间纤维的非极性。
- 中间纤维网络比肌动蛋白纤维和微管都要结实，并且压力越大越坚固。

中间纤维蛋白的结构信息已通过一级氨基酸序列、同源模型和生化分析获得，其片段的晶体结构也在渐渐地得到。

如图 9.15（见图版）所示，中间纤维组装的第一步是通过 α 螺旋杆状结构域的相互盘绕形成“麻花”状螺旋二聚体。在自然界中 α 螺旋是最常见的蛋白质二级结构，并且首次发现就是在中间纤维蛋白中。中间纤维蛋白的 α 螺旋非常地长。为了在细胞质中保持稳定，杆状结构域必须与另一个中间纤维蛋白的 α 螺旋杆部盘绕成麻花螺旋。这些相互作用的必要性表现在：盘绕的 α 螺旋缩短了长度的肽链是由疏水残基组成，在胞质水溶液中表现出单体不稳定性。蛋白质 α 螺旋的每七个氨基酸残基转两弯（分别称作 a～g 位）。a 位和 d 位的残基是特别不亲水的（通常是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸和甲硫氨酸）或大侧链的（通常是苯丙氨酸和色氨酸）。在形成麻花螺旋过程中，a 位和 d 位的疏水残基被掩蔽在两条螺旋多肽之间（α 麻花螺旋蛋白的结构也称为“亮氨酸拉链”序列）。45nm 长的麻花螺旋二聚体进一步组装成 10nm 宽的中间纤维。如果中间纤维蛋白间没有发生相互作用，那么单体就会错误折叠并被水解破坏（蛋白质折叠的细节见 3.18 蛋白质组装成复合物的过程受到监控）。

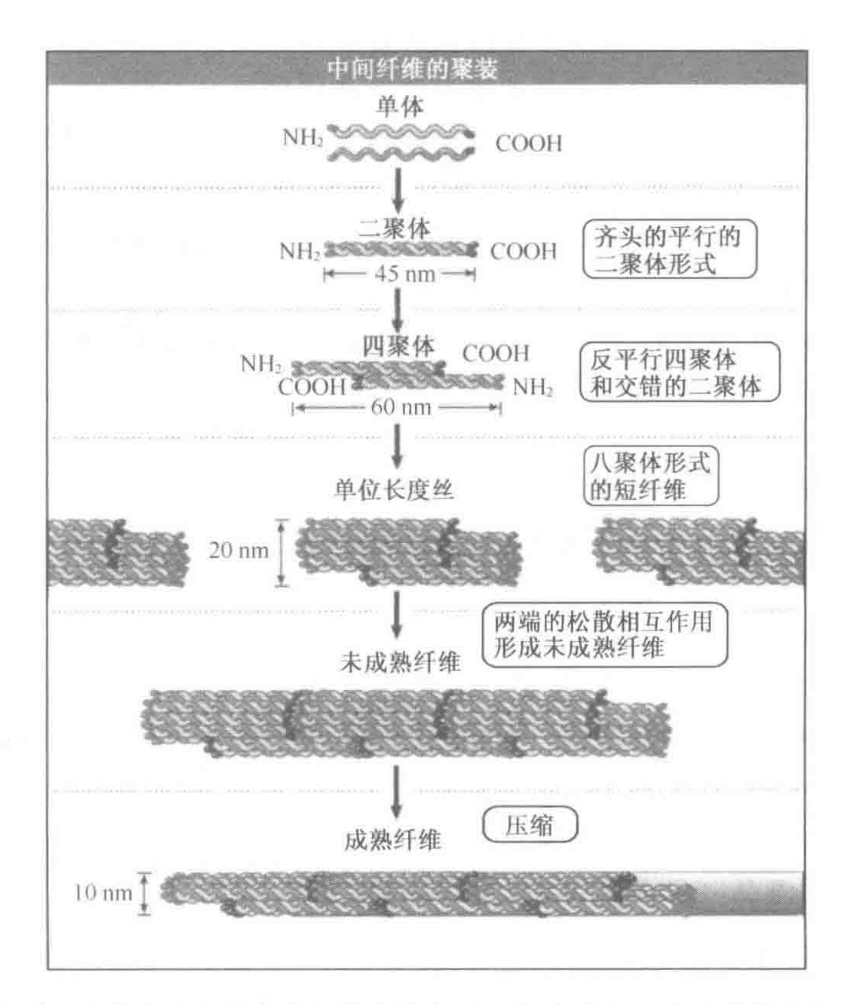


图 9.15 哺乳动物蛋白中间纤维的组装通用模型。组装成为二聚体是快速的，这是防止蛋白质被水解所必需的。四聚体可能是在体内存在的最小形式。为了简明，非螺旋区域没有显示。杆状结构域的螺旋边界序列用红色（N 端）和蓝色（C 端）标出。

角蛋白分析对于早期推测纤维组装的很多特性十分有用，因为研究人员可以很容易地分析Ⅰ型/Ⅱ型二聚体形成的必需条件。细胞中单体角蛋白不稳定、易降解，因此在细胞中表达不同二级结构的角蛋白被用来检测哪些分子特性与角蛋白二聚体的形成有关。证明单体是不稳定的实验表明，相同角蛋白形成二聚体不能组装成纤维，而异源角蛋白二聚体则可以有序地平行组装。

中间纤维是非极性的并且是多股聚合体，因此其组装分析很有挑战性。几乎所有的有价值的信息都来自与杆状结构域相关的体外实验。图 9.15 是普遍认同的细胞质型中间纤维的体外装配模型。在此模型中，细胞质中间纤维蛋白二聚体快速地形成反平行、半交错的四聚体，这种四聚体可能是最小的稳定单位（与此形成对比的是，核纤层纤维的装配是按着尾部对尾部的平行二聚体结合形成丝，并且二聚体不会像细胞质蛋白一样横向形成四聚体）。细胞中聚合体的装配也可能是很快速的，但是在使其速度慢下来的体系中，表现为以下三个步骤：

- 八个四聚体快速侧向结合形成长约 60nm，宽 20nm 的“单位长度丝”（unit length filaments，ULF），然后
- ULF 两端对接形成松散的、粗的未成熟纤维，再然后
- 更进一步的构象压缩使未成熟纤维形成 10nm 长的、表面光滑的成熟纤维，横

截面包含 32 股多肽链。

尽管不同蛋白在各阶段的速度和效率有所不同，但已经观察分析了几个来自不同有机体的中间纤维蛋白的装配次序。这个装配模型与已知的中间纤维蛋白的次序特点是一致的：四聚体侧向连接形成由 ULF 位于杆状结构域的电荷的相互作用驱动，四聚体两端对接形成丝的过程发生在保守的螺旋边界区域。在亚基装配成丝的过程中，螺旋边界肽的重叠的结构预测（图 9.3）解释了为什么发生在螺旋边界区域的突变的危害会如此之大，以及为什么在 K5/K14 中这些位点的突变会造成在 EBS 中的严重皮肤脆化。

对来自组织的成熟丝的邻里之间的相互作用分析发现，它们的侧向相互作用比四聚体的要强很多。部分原因可能是在挤压的过程中，随着亚基被挤得更加靠近，纤丝纵向滑移，丝间的相互作用加强直到它达到完美的成熟构造。更深入的调整可能源自于尾部结构域之间的相互作用，这一步没有在图 9.15 中标出。结构数据显示头部结构域可能与同一分子或邻近分子的杆状结构域相互作用，并且尾部结构域可能更加紧密（因为它们在核纤层蛋白中）。

图 9.16 显示了根据这些信息形成的波形蛋白模型，包括部分波形蛋白杆状结构域的晶体结构和由模型中预测的结构。在该模型中，我们可以看到长长的 α 螺旋二极结构域在二聚体中是如何相互盘绕的，这里所给出的是反向平行的半重叠方式，正如人们认为其在四聚体中存在的那样。根据中间纤维的类型，二聚体可以是同源二聚体（像波形蛋白）或者异源二聚体（像角蛋白）。

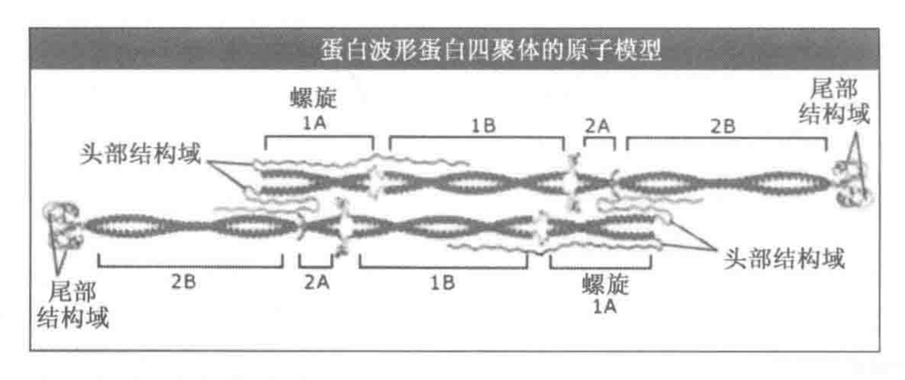


图 9.16　Ⅲ型蛋白波形蛋白同源聚合的原子模型，根据部分蛋白的晶体模型和其他的同系模型综合而成。当蛋白装配成丝，头部结构域很可能在标示的区域与杆状结构域结合。经许可复制自 *Annual Review of Biochemistry*，Volume 73。© 2004. by Annual Reviews (www.annualreviews.org)。照片由德国癌症研究中心的 Harald Herrmann 和巴塞尔 M. Muller 研究所的 Ueli Aebi 惠赠。

我们对中间纤维在体内的装配知之甚少。在细胞中几乎不存在非聚合的中间纤维蛋白（每个细胞中约有 5%单体角蛋白，而肌动蛋白和微管蛋白则有 25%～50%）。预测的不稳定的 α 螺旋杆状结构域的特性意味着合成后的快速装配或与伴侣蛋白结合，伴侣蛋白可以与靶蛋白结合以保证它们的正常折叠，通常发生在装配的中间阶段。某些伴侣蛋白，例如小热激蛋白 Hsp27 和 αB 晶体蛋白，能与中间纤维蛋白相互作用，特别是当细胞受到压迫的时候。

因为中间纤维蛋白互相依赖来矫正折叠（也就是说，通过与别的中间纤维蛋白快速地形成麻花螺旋二聚体以防止错误的折叠和降解），中间纤维蛋白最重要的伴侣可能是与它进行装配的那个蛋白。对在处于分化中的组织中连续的、重叠的改变的表达的观察

发现，处于分化中的细胞可能通过将新合成蛋白竞争性地替代纤维上已存在的中间纤维蛋白来改变中间纤维的表达，如此原来的纤维作为新纤维的一种装配模板。

在体外对中间纤维的生物物理分析显示它们对张力的耐受性比微管和肌动蛋白纤维更强，如图 9.17 所示。另外，对角蛋白中间纤维的拉伸测量发现它们具有很长的拉伸度，很大的弹性范围，和拉伸纤维的不可逆弹性形变。在体外环境中，不同类型的中间纤维在受到机械拉伸时具有不同的生物物理性质。不同于微管和肌动蛋白纤维，当中间纤维受到更多的张力的时候表现出逐渐增加的对扭曲的耐受性（这种性质被称作机械应变强化）。

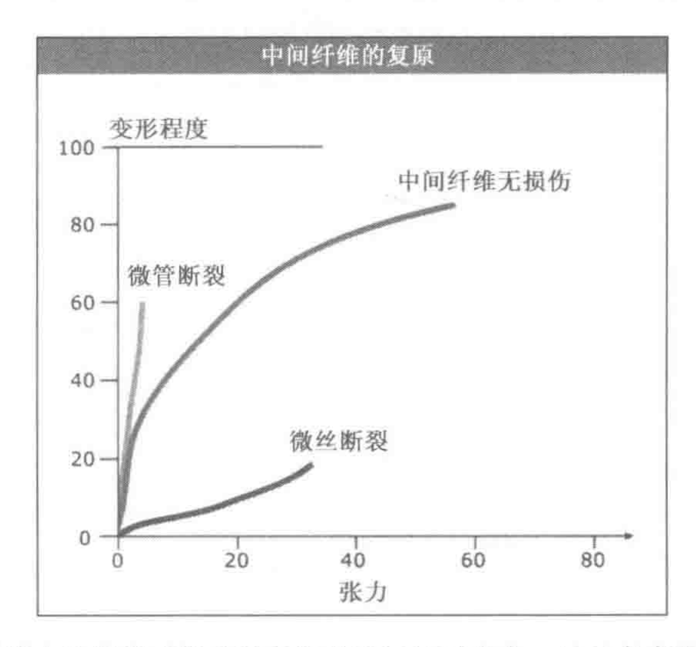


图 9.17　中间纤维比微管或肌动蛋白纤维更加地耐张力，后两者在更低的压力下就会撕裂。张力由施加于从细胞中纯化的纤维上的剪切力所造成的形变（拉伸）的大小来度量。修改自 *The Journal of Cell Biology*，1991，vol. 113，pp. 155-160，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。同时获得 Pennsylvania 大学健康系统医学与工程研究所的 Paul A. Janmey 的许可。

9.9　转录后修饰调控中间纤维蛋白的构型

关键概念

- 中间纤维是动态的，并表现出周期性的重建。
- 一些转录后修饰会影响头部和尾部结构域。
- 磷酸化是细胞中中间纤维重建的主要机制。
- 蛋白酶水解调控蛋白的数量并促进凋亡。

不同于微管的情况，没有证据显示有任何的组织中心优先引发细胞中中间纤维的装配。在体外，中间纤维蛋白的装配是容易的而且不需要任何辅因子，并且纤维的非极性意味着装配可以在任何一端发生。长的中间纤维的自由末端即使是在体外也是不常见的。然而，如图 9.18（见图版）所示，培养的活细胞通过荧光放射同位素示踪可以观察到片段以及微粒。这些片段很显然是在细胞的外围，这些可能是非常容易发生装配和解聚的地方。

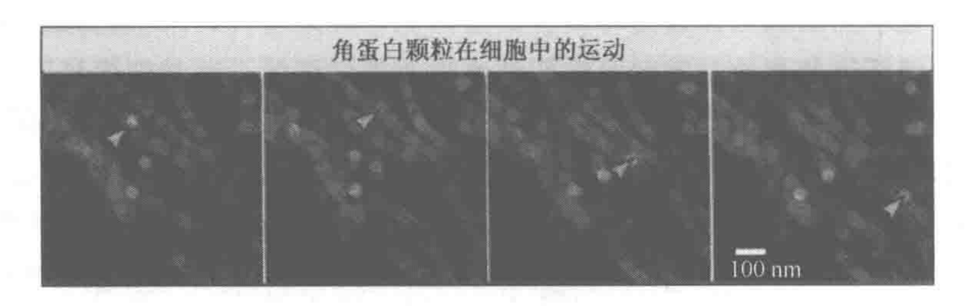


图 9.18　中间纤维蛋白的微粒在细胞质周围沿着不同类型的细胞骨架蛋白移动，可能由马达蛋白携带。按照时间顺序，由绿色荧光蛋白标记的角蛋白微粒（箭头指向的）沿着微管移动（红色，在边缘的），其中弯曲的微管部分位于焦平面内，部分位于焦平面外。照片由 Dundee 大学生命科学学院的 Mirjana Liovic 和 Birgit Lane 惠赠。

中间纤维蛋白可以通过磷酸化、糖基化、法尼基化以及头部和尾部结构域的转谷氨酰胺作用来修饰，其降解也是酶促的。然而，大部分饰对中间纤维功能的影响还知之甚少。

中间纤维的重组装，即重新形成细胞中的蛋白网络或者分布，需要定位和控制解聚以及重新装配；细胞分裂是这些发生时的一个事件。中间纤维蛋白的磷酸化在有丝分裂期间是十分重要的。有丝分裂激酶 Cdk1 磷酸化核纤层蛋白（A 型和 B 型）使得核膜解聚。另外，细胞质中间纤维必须在有丝分裂时短暂地变得松弛以使得细胞可以分裂成两个。Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型蛋白在前期和胞质分裂期被磷酸化；波形蛋白 GFAP、巢蛋白和 K18 都含有能被 Cdk1 磷酸化的保守位点，并且其他的激酶可能也起了一定的作用。在一些培养的上皮细胞中，在有丝分裂起始时，可以清楚地观察到细胞质纤维体系从纤维态到重新组装状态的重新分布，在胞质分裂之后又重新形成纤维。在组织中，细胞质中间纤维可能不会完全地解聚再形成聚集，而是可能仅仅变得松弛或者在卵裂沟处部分地解聚。

磷酸化也是周期外细胞的中间纤维重排的最重要机制。中间纤维组装和解聚的调节不依赖于核苷的水解周期（正如肌动蛋白和微管一样），而是依赖于磷酸化和去磷酸化。在中间纤维蛋白所有的序列同源性组中已经发现了许多丝氨酸磷酸化位点，它们的激酶影响因子在一些例子中已经有所了解，但是完整的图谱只在少数中间纤维蛋白中完成了。磷酸化靶位点显著地位于非螺旋的头部和尾部结构域（图 9.3），在这里任何的电荷增加都会促进非纤维化状态。因此，磷酸化会导致负电荷的增加和纤维聚合度的降低。简单角蛋白的磷酸化是对压力激活蛋白激酶产生的压力的响应。在成肌细胞的分化过程中巢蛋白以磷酸化来调节它的表达。神经纤维尾部结构域是高度磷酸化的；这被认为决定了有效轴突的形成，因为它导致了带负电荷的尾部结构域相互排斥并且在纤维轴的正确位置延伸。磷酸化也可以与其他信号分子一起调节中间纤维蛋白的相互作用。

在中间纤维蛋白中也检测到了其他的翻译后修饰，包括核纤层蛋白的膜锚定的法尼基化、豆蔻酰化、一些角蛋白的转谷氨酰胺化、二硫键的形成，以及糖基化。这些中间纤维蛋白的修饰大部分是组织特异性的。角蛋白的转谷氨酰胺化发生在基质上层和毛囊中。在表皮中，这种修饰可以导致角化细胞分化末期角质层的形成，从而使它们高度抗压。转谷氨酰胺化也参与了毛发的中心层毛囊的坚硬细胞结构的形成。半胱氨酸残基在

中间纤维蛋白中不是很常见，但是二硫键的形成在角化细胞分化末期的硬质角蛋白结构的成熟期间发生在某些角蛋白中。糖基化（*O*-相关的 *N*-乙酰糖基化）已经在 K18、K13、NF-M 和 NF-L 中检测到了。在 K18 中，它似乎与蛋白的溶解状态或解聚状态有关，并使单体储存得以增加。

中间纤维的蛋白水解对于调亡细胞的清除是十分重要的，并帮助调节两种共表达的角蛋白的数量平衡，这已经被转染实验所证实。角蛋白纤维只能由Ⅰ型Ⅱ型异源二聚体形成，如果一种类型的角蛋白过量，那么过量的未聚集角蛋白就会通过蛋白水解被清除。中间纤维蛋白的泛素化成为它们蛋白水解的标记，并且已经在从神经退行性失调到肝硬化等一系列疾病的蛋白组装特征中检测到了。像磷酸化一样，泛素化也与冲击有关（泛素化的细节见 BCHM：9-0001、EXP：9-0001和EXP：9-0002）。

作为凋亡细胞快速清除的一部分，中间纤维蛋白被半胱氨酸蛋白酶（caspase）降解，半胱氨酸蛋白酶裂解位点已经在波形蛋白、核纤层蛋白、K18（如图 9.3 所示）中被发现了。中间纤维在细胞凋亡中的命运的研究大部分集中在上皮中细胞的核纤层蛋白和角蛋白上，而上皮细胞是最经常参与到分化和癌变等主要的形态发生事件中的细胞（细胞凋亡的失败造成了疾病的发生）。核纤层蛋白和Ⅰ型角蛋白在 α 螺旋杆状结构域正中央的连接处有一个保守的半胱氨酸蛋白酶靶位点。Ⅱ型角蛋白缺少这个位点，但是由于它们没有Ⅰ型角蛋白便不能聚合，因此只需要破坏细胞中这两种类型角蛋白的一个就可以瓦解整个网络。在 K18 的 C 端部分也有一个半胱氨酸蛋白酶靶位点，它在任何细胞凋亡发生的标志（例如 DNA 的断裂或膜极性的缺失）出现之前就被 3 和 7 半胱氨酸蛋白酶降解，并且产生有用的、独特的抗体识别抗原决定簇，可被用来监控细胞凋亡活动的早期步骤（半胱氨酸蛋白酶的细节见第 12 章细胞凋亡；癌症的细节见第 13 章癌症——原理和概述）。

9.10 中间纤维的结合蛋白是偶发的而非必需的

关键概念

- 中间纤维蛋白的装配不需要结合蛋白。
- 特异中间纤维结合蛋白包括细胞与细胞间以及细胞与基质间的连接蛋白以及角化细胞的末端分化基质蛋白。
- 瞬时结合蛋白包括不同的多功能的细胞骨架连接因子的斑蛋白家族。

中间纤维蛋白不需要其他蛋白的帮助来组装或形成纤维，至少在体外是这样的。某些中间纤维，例如角蛋白，具有横向组装形成束的倾向，而其他的，例如波形蛋白，在细胞质中则是单独存在的，但是两种性质是中间纤维固有的。然而，在一个活细胞内纤维必须与其他蛋白质相互作用来使细胞具有有效的功能。这些相互作用的蛋白质是多种多样的，常常是多功能的，很少只对某种有特异性。中间纤维与斑蛋白和微管马达蛋白瞬时相互作用。核纤层蛋白和核膜复合体之间的、角蛋白或结蛋白和连接蛋白之间的，以及角蛋白和末端分化基质分子之间的特异的、选择性的相互作用已经有了较好的研究。在后面的例子中相互作用是本质上不可取消的。

大部分广泛分布的中间纤维结合蛋白是被称作斑蛋白的细胞骨架连接蛋白。斑蛋白

也叫做细胞连接蛋白，广义的斑蛋白，形成一个大的、多功能的与中间纤维、肌动蛋白纤维和微管相互作用的蛋白家族。这些与中间纤维结合的蛋白包括网蛋白、桥粒斑蛋白（desmo 斑蛋白）、BPAG1（BP230）、envoplakin 和 periplakin。大部分这类蛋白具有多种由可变剪切产生的同源体。它们也含有能与多种细胞骨架蛋白作用的蛋白结合结构域，在许多例子中结合肌动蛋白纤维和（或）微管的同时也有中间纤维蛋白的结合，并且大部分在上皮和其他组织中表达。桥粒斑蛋白在层积鳞片上皮中是细胞骨架的桥粒的主要结构组成，BPAG1 和网蛋白在半桥粒中占据相等的位置。网蛋白在中间纤维和微管间形成连接，如图 9.19（见图版）所示，并且参与到细胞中不同的细胞骨架体系的整合中。斑蛋白家族的成员也与组织脆化失调有关，例如由网蛋白突变造成的伴有皮肤水疱的肌肉营养不良。

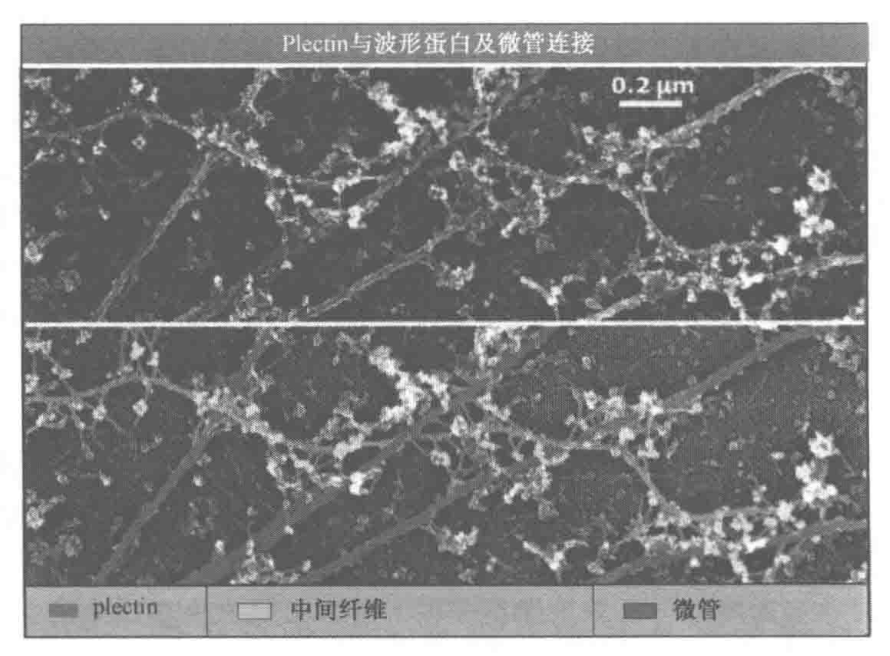


图 9.19　斑蛋白与中间纤维结合并将它们和肌动蛋白纤维以及微管整合。这些扫描电镜照片显示微管以及中间纤维与巨大的斑蛋白、网蛋白的相互作用。下图是上图的伪彩色形式。网蛋白与金（黄色）颗粒连接。照片由 Pennsylvania 大学的 Tatyana M. Svitkina 惠赠。复制自 *The Journal of Cell Biology*，1996，vol. 135，pp. 991-1007，获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

另一组与中间纤维蛋白瞬时结合的蛋白是力蛋白（dynein）和动蛋白（kinesin）马达蛋白，它们沿着微管运送“货物”；中间纤维蛋白可能是其“货物”的一种。绿色荧光蛋白（GFP）标记的角蛋白微粒通过活细胞成像观察发现它们沿着微管以及肌动蛋白纤维运动（图 9.18）。

另外，某些蛋白质，例如聚角蛋白微丝蛋白（filaggrin），在分化终端与角蛋白纤维相互作用，在表皮的最上层形成致密的物理弹性复合体，它对于形成皮肤主要的保护层是非常重要的。聚角蛋白微丝蛋白的突变会导致皮肤干燥和湿疹。在特异表皮附属结构的形成中，角蛋白与分化通路的特异蛋白相互作用，正如在毛发轴形成过程中 trichocyte 角蛋白与角蛋白相关蛋白（KAP）广泛的相互作用。KAP 是有高含量的巯基或者许多的甘氨酸以及酪氨酸残基的小蛋白。这些蛋白富含半胱氨酸残基并且与角蛋白形成广泛的相互联系从而在细胞中形成一个致密的基质，例如毛发和指甲，来形成完全硬化的组织结构。

9.11 中间纤维基因贯穿于整个多细胞动物进化

关键概念

- 中间纤维基因在所有已经分析的多细胞动物基因组中都存在。
- 中间纤维基因家族的进化是由复制和置换、再进一步的置换导致的。
- 人类有 70 种基因编码中间纤维蛋白。
- 人类角蛋白基因是集中成群的，但是非角蛋白中间纤维基因是分散的。

随着不同有机体基因组信息的增加，我们可以尝试估测在从哺乳动物到原始多细胞动物中发现的编码中间纤维样蛋白基因的可能的进化史。中间纤维在运动的多细胞有机体中可能是特异进化的。细胞质中间纤维表现出沿着在多细胞有机体中加固细胞和组织的方向进化，而不是沿着外部支持细胞（例如一个坚硬的外骨骼）的进化路线。

在多细胞动物中有两个中间纤维基因的直系后代：一个是具有较长的 1B 螺旋结构域的类核纤层蛋白（L），另一个是像人类细胞质中间纤维一样较短的螺旋（S）。这两种形式早在无脊椎原肢类动物和包括脊椎动物（具有脊椎的动物）及其他具有脊索结构（适当的脊椎的前身）的脊索动物分开之前，就已经出现了分歧。原肢类动物只有 L 型，而在所有的脊索动物中这两种类型都是存在的，在现代核纤层蛋白中有 L 型，现代细胞质中间纤维中有 S 型。这强烈地支持了中间纤维基因家族具有一个类核纤层蛋白的祖先的可能性。

脊椎动物和无脊椎动物的中间纤维蛋白也有许多相似之处，证明了在原肢类和后口类动物分歧之前的性质。例如，蠕虫（*Caenorhabditis elegans*）的某些中间纤维蛋白的组装特性与角蛋白相似，反映了四聚体的专一相互作用特性的早期进化。与此不同的是，果蝇（*Drosophila melanogaster*）有两个核纤层蛋白基因却没有细胞质纤维：在有外骨骼的动物中，中间纤维的进化不是如此的必要。果蝇表现出已经适应了以微管来满足某些细胞所需的加固功能。

中间纤维基因家族的扩大可以平行地追溯到脊索动物的进化复杂性的增加。例如，最原始的脊索动物之一，海鞘（*Ciona intestinalis*）有五个中间纤维基因，而与脊椎动物和无脊椎动物接近的一种生物文昌鱼（*Branchiostoma*）则有 13 个，河豚（*Fugu ribripes*）有 40 多个，人类有 70 个。

内含子在基因中的定位可以给它们的进化史提供线索。大部分中间纤维基因有 5～7 个内含子，在相似的情况下分布在整个杆状结构域的编码区，如图 9.20 所示。其中至少有 5 个内含子的位置在人类基因组和低等脊椎动物基因组（*Fugu ribripes*）之间是保守的。Ⅳ型内含子的不同模式显示了神经纤维与其他中间纤维的不同进化来源，可能是基于反向转录的机制，例如，许多内含子看起来正在丢失。

对假基因（pseudogene）缺少内含子的解释是在进化早期由逆转录病毒的活动形成的加工型假基因（processed pseudogene）（逆转录病毒带着自身的 RNA 基因组感染细胞，通过逆转录增殖 DNA 并插入到寄主的基因组中）。一些中间纤维基因有 1～2 个假基因，但是原始的简单角蛋白 K8 和 K18 则有数量惊人的假基因：K8 有 35 和 K18 有

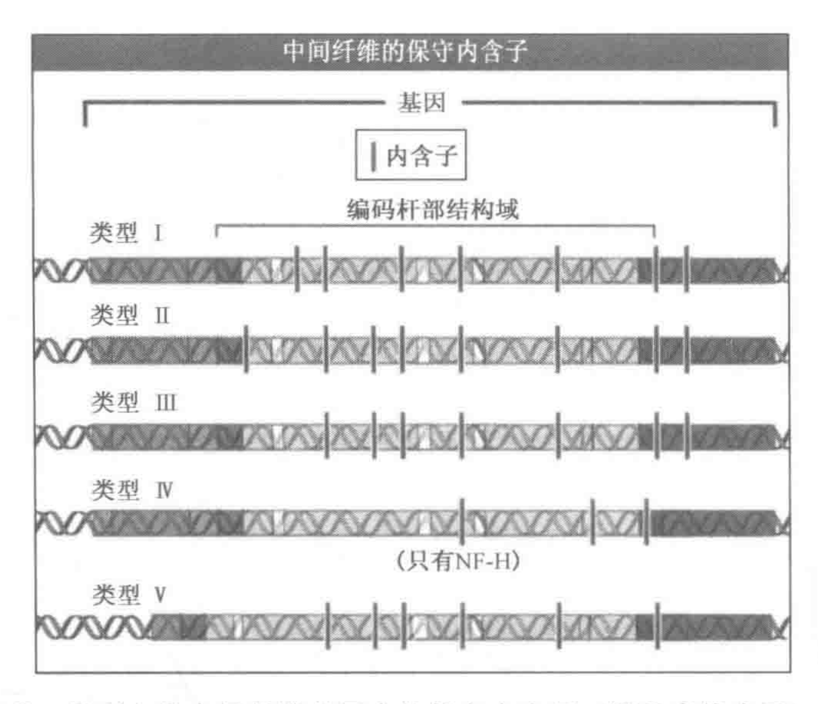


图 9.20　在Ⅰ～Ⅴ型人类中间纤维基因中的保守内含子（用垂直线表示）的相关位点（包括某些可变尾部内含子）。

62个，加上一些碎片，分散于整个基因组中。因为KRT8和KRT18基因在胚胎发生的早期转录，此时只有少数几个细胞，任何由其衍生出的逆转录病毒转座都可以被整合保留在种系中并因此固定在基因组中。

基因组中的相关基因的近似性可以为这些基因的起源提供证据。人类角蛋白基因的两个家族集中于染色体12和17的两个致密位点，暗示了它们起源于复制事件。聚集在染色体17q21.2上的Ⅰ型角蛋白含有28个Ⅰ型功能基因中的27个，以及在970kb范围内有5个假基因，包括在一个或两个方向上转录的基因。该角蛋白基因簇被一个350kb的编码32个KAP或角蛋白相关蛋白的基因簇隔断。染色体12q13.13含有Ⅱ型的基因簇，在780kb的DNA中有27个有功能的基因（26个Ⅱ型基因和一个Ⅰ型基因），外加8个假基因，且所有基因都在一个方向转录。单独位于12q上的Ⅰ型基因是胚的简单上皮角蛋白K18，独特地与其配体蛋白K8定位在一起。

我们是否能建立这个庞大、异质的基因家族的进化顺序，并能对其已知功能做出合理的解释呢？具功能的核纤层蛋白在进化上具有“优先权”，作为一个保存DNA长链完整性的强化盒子，在早期的自然选择中颇受偏爱。核纤层蛋白基因一定是将其核定位和锚定的序列特性进化传递进入细胞质中间纤维基因。中间纤维的序列在哺乳动物中有很高的保守性，并且在哺乳动物物种增多和形成之前明显地出现了分歧。在脊索动物的进化中，角蛋白因复制和易位事件而变得多种多样的同时，上皮细胞的复杂性变得更有优势。K8（Ⅱ型）和K18（Ⅰ型）可能是最古老的角蛋白，并且可能是最先分支出来的。胚胎的K8与Ⅲ型蛋白有更近的关系，H1/H2结构域丢失的复制会导致产生不再能够自我装配的角蛋白——祖先K18或Ⅰ型角蛋白的前体。复制和易位然后可能将K18从Ⅰ型角蛋白的目录中分离出来，并且更多的平行复制事件扩大了这两个位点的距离，它们现在位于人类的12和17号染色体上。丝胞或毛发角蛋白在进化上可能是最晚出现的，导致哺乳动物的毛皮、头发和爪的出现，人类和大型猿类之间“最近的”变化显示

这个过程仍然在进行着。建议的进化顺序如图 9.21 所示。因为它们有一个特殊的基因结构，所以Ⅳ型蛋白很难放在这个图解中，所以没有示出。

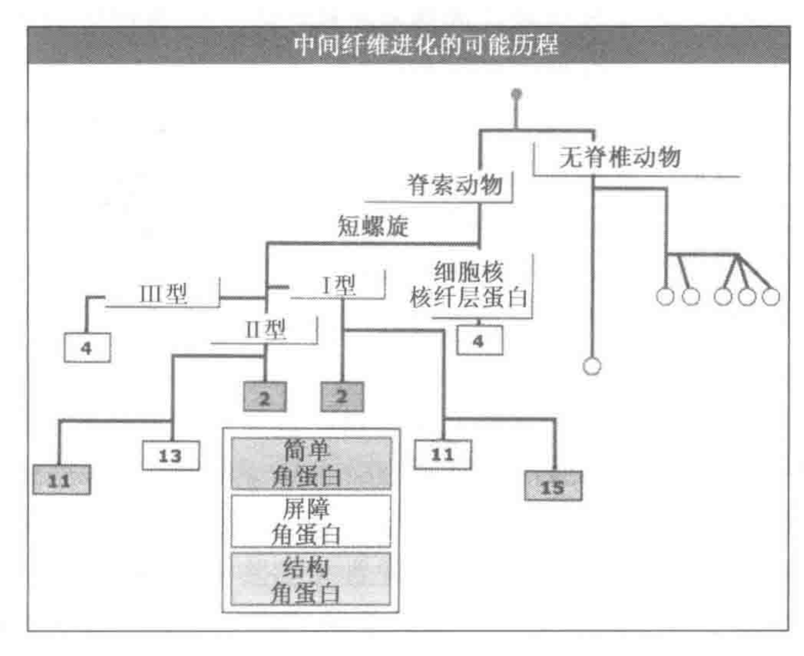


图 9.21 人类Ⅰ～Ⅲ型和Ⅴ型中间纤维基因的可能进化关系。无脊椎动物只是象征性的；方框中的数字代表了每组中基因的数目。

最后，在目前研究过的植物和真菌基因组中，没有发现任何序列具有中间纤维的识别特征。因此，尽管核纤层蛋白对动物细胞连接是如此的古老和重要，没有核纤层蛋白的情况下适宜细胞核组织也可以获得成功，即由紧致的细胞壁来代替。在病毒中已经发现了一个类中间纤维蛋白——在弯曲的新月柄杆菌（*Caulobacter crescentus*）中的 *crescentin* 蛋白，以及在幽门螺杆菌（Helicobacter pylori）中的类似基因，与胃溃疡敏感性相关的普遍胃病原体。在这两个例子中，尽管其氨基酸序列不可被归为中间纤维，但这些蛋白质可能负责维持细胞形状，并表现出与动物中间纤维蛋白的功能同源性。这些趋同进化更进一步地支持该假说：之所以中间纤维基因家族在多细胞动物中进化成如此地庞大、多样是由于这些蛋白质对于维持组织中细胞的形状非常的重要。

9.12 展望

在 20 世纪 70 年代的分类信息大幅增加之后，直到 20 世纪 90 年代科技进步出现之前，对中间纤维功能的认识进展缓慢。DNA 测序更加快速，显微镜技术更加强大，活细胞成像开始飞速发展。对于在病理条件下有缺陷的中间纤维所造成的破坏性影响的清楚认识也取得了飞跃性进展。活细胞成像的使用，尤其是样品厚度的增加，使得我们进入了细胞生物学的新时代，在功能性环境下细胞骨架蛋白动力学将会被更好地阐释。

接下来呢？这个问题将由这些新的技术来回答。我们需要观察在活细胞中中间纤维的动态，我们还需要知道更多有关活体组织中的动态是如何被调控的。只有这样，我们才能开始理解为了机械弹力的需要而进化出的中间纤维在外部环境需要的条件下是怎样改变细胞的状态和基因的表达的，就像它们在发育和疾病过程中表现得那样。当生长在培养皿中时，细胞的弹性几乎不能被严格地评估。厚样品的显微镜技术和培养技术还需

要进一步的发展，以使我们能够在活有机体中高分辨率地观察细胞并避免显影造成的假像。

简单上皮角蛋白的功能是当前辩论的热点。K8/K18 的表达清楚地保护了组织和细胞，抵御不同压力，从化学毒性压力到细胞凋亡。人类 K8/K18 的突变是许多紊乱的危险因子。参与中间纤维信号转导的通路现在已开始被阐明，但是是否所有的压力最终都能被描述成化学压力（就像我们所清楚的屏障组织中角化细胞角蛋白那样）仍然是需要讨论的。中间纤维也保护细胞抵抗渗透压，如果细胞的新陈代谢停止并且膜离子泵失活，可能是毒性冲击信号通过中间纤维机械地应变渗透压。

对于新发现的中间纤维蛋白的表达也需要更加深入的研究，其重要性在某种程度上取决于为什么这些新基因会被忽视而直到现在才发现。一些蛋白质在体外很难分析是因为它们是极度不溶的。某些可能是次要的角蛋白，这可能是对功能不太重要的（可能是新进化出的基因?），也可能是在发育期的过渡点非常重要的（像巢蛋白），或者位于非常特殊的组织环境中（像联丝蛋白，或者晶状体蛋白）。其他可能被漏掉的是由于表达它们的组织不常被用于分析，或者它们的生化性质与其他已知的蛋白质十分类似。

已知大约有 40 种人类疾病是由于中间纤维的突变导致的，并且肯定还有更多未知的。其中一些在临床上可能是隐性的，这是由于多种中间纤维蛋白重叠表达方式的保护作用，或者是由于组织的位置难以检测且又在疾病的极早期而无法观察到，如肠道炎症疾病可能发生的情况那样。考虑到细胞在不同组织中失去弹性的因果关系时，中间纤维疾病的全谱就可能变得清晰起来，进而可以认识到由其导致的临床或病理的下游结果。当我们开始明白中间纤维缺陷导致的病理有多广泛时，新发现的中间纤维疾病的增加会极大地促进治疗这些遗传性失调的新策略的发展——并且需要一些创造性思维来使因人制宜的基因治疗方法更趋完美。

9.13　总结

中间纤维是细胞骨架的主要成分，对于维持正确的组织结构和功能是十分重要的。它们在细胞质和细胞核中以 10nm 粗的纤维构成坚固的网络（中间纤维的直径介于肌动蛋白纤维和微管之间）。这些蛋白质由一个庞大的基因家族编码，并且具有相似的结构，包括一个位于中心的 α 螺旋长杆状结构域，两端为一个头部和一个尾部结构域，二是翻译后修饰的作用位置，并且通过它们的磷酸化来调节组装。尽管蛋白质和蛋白质之间的动力学是不同的，但在体外的组装都是快速的并且不需要其他的因子。二聚体是反平行的，四聚体组装成亚单位（由此使得最终的纤维是非极性的），在体外，快速地横向、纵向结合，形成 10nm 粗的纤维。成熟的中间纤维网络是高度抗张力的，并且响应张力而变得更加牢固。

不同类型的中间纤维具有高度特异的组织分化表达方式，它们的抗体在细胞生物学和病理学中是监控分化的有力工具。大部分的中间纤维蛋白是角蛋白（Ⅰ型和Ⅱ型），在表皮中表达（片层组织）。简单角蛋白（K8/K18）是特异性最小的，并且可能在进化上是最为古老的，相反，结构丝胞（毛发）角蛋白可能是最新进化的。在屏障组织的角质形成细胞中发现的角蛋白亚型在所有中间纤维蛋白质亚型中是最为多变的、进化得最好、最有弹性的。Ⅲ型和Ⅳ型的表达范围有所重叠，并在组织中常常是异源聚合的；

它们在连接、神经、肌肉和造血组织中表达。波形蛋白代表了小分子质量、非上皮表达的中间纤维和单细胞所特有的蛋白。Ⅴ型蛋白——普遍存在的古老的核纤层蛋白，强化了核膜，它通过翻译后修饰所产生的膜锚定位点与核膜相互作用。核纤层蛋白，也许所有的其他中间纤维蛋白，在有丝分裂期间被磷酸化而解聚以使染色体和细胞质得以分裂。从中间纤维基因扩增出的 RNA，尤其是核纤层蛋白，是选择性拼接的。

许多种类的疾病与中间纤维基因的突变有关。对于一个基因的突变来说，这些失调很不明显，但是多个突变的叠加所导致的与中间纤维相关的疾病却是非常显著的。疾病的研究已经证实中间纤维为细胞提供物理弹性，在诸如单纯大疱性表皮松解病中，突变使得组织细胞脆化并容易被破坏。许多与细胞质中间纤维突变有关的疾病具有蛋白聚集的特征。这些聚集对疾病表型的贡献程度，即削弱纤维弹性对疾病的直接贡献，而非疾病的外在病理特征，是当前讨论的热点。

中间纤维的重组发生在有丝分裂和细胞增殖过程中，并且主要由磷酸化和去磷酸化驱动。蛋白酶降解调控着蛋白的数量并促进细胞凋亡。中间纤维蛋白的结合蛋白对于中间纤维发挥功能不是必需的，并且通常是分化特异性的；诸如聚丝蛋白那样的蛋白可能因组织功能而修饰纤维，相反，斑蛋白（plakin）之类的蛋白，在细胞中的作用则是限制纤维的解聚。

中间纤维基因出现在所有的已经分析过的后生动物基因组中，并且可能来源于一个类似核纤层蛋白的远祖基因。今天的中间纤维基因家族的进化是由于不断地复制、易位、再复制，就像目前了解得最清楚的现代哺乳动物中占支配地位的中间纤维组——角蛋白所揭示的那样。人类角蛋白基因在 12 号染色体（Ⅱ型基因以及Ⅰ型 K18）和 17 号染色体（其他Ⅰ型基因）上成簇存在，而 16 个非角蛋白基因则分散于整个基因组。中间纤维基因是紧凑的，在序列同源性组中，内含子的位置是普遍保守的，并且大部分的基因只编码一个蛋白。

参 考 文 献

9.2 六类中间纤维蛋白结构相似但表达不同

综述

Steinert, P. M., and Parry, D. A., 1985. Intermediate filaments: conformity and diversity of expression and structure. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 1 p. 41–65.

研究

Sun, T. T., Eichner, R., Nelson, W. G., Tseng, S. C., Weiss, R. A., Jarvinen, M., and Woodcock-Mitchell, J., 1983. Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J. Invest. Dermatol.* v. 81 p. 109s–115s.

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., and Krepler, R., 1982. The catologue of human cytokeratin polypeptides: Patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* v. 31 p. 11–24.

Hatzfeld, M., and Weber, K., 1990. The coiled coil of *in vitro* assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: Use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J. Cell Biol.* v. 110 p. 1199–1210.

Lu, X., and Lane, E. B., 1990. Retrovirus-mediated transgenic keratin expression in cultured fibroblasts: Specific domain functions in keratin stabilization and filament formation. *Cell* v. 62 p. 681–696.

Rogers, M. A., Winter, H., Langbein, L., Bleiler, R., and Schweizer, J., 2004. The human type I keratin gene family: Characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain. *Differentiation* v. 72 p. 527–540.

Rogers, M. A., Edler, L., Winter, H., Langbein, L., Beckmann, I., and Schweizer, J., 2005. Characterization of new members of the human type II keratin gene family and a general evaluation of the keratin gene domain on chromosome 12q13.13. *J. Invest. Dermatol.* v. 124 p. 536–544.

9.3 I型和II型角蛋白是两组最大的中间纤维

综述

Coulombe, P. A., and Omary, M. B., 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 110–122.

Lane, E. B., and Alexander, C. M., 1990. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin. Cancer Biol.* v. 1 p. 165–179.

研究

Sun, T. T., Eichner, R., Nelson, W. G., Tseng, S. C., Weiss, R. A., Jarvinen, M., and Woodcock–Mitchell, J., 1983. Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J. Invest. Dermatol.* v. 81 p. 109s–115s.

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., and Krepler, R., 1982. The catologue of human cytokeratin polypeptides: Patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* v. 31 p. 11–24.

Purkis, P. E., Steel, J. B., Mackenzie, I. C., Nathrath, W. B., Leigh, I. M., and Lane, E. B., 1990. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J. Cell Sci.* v. 97 p. 39–50.

Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A., Rogers, M. A., and Wright, M. W., 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J. Cell Biol.* v. 174 p. 169–174.

9.4 角蛋白的突变导致上皮细胞的脆化

综述

Fuchs, E., and Cleveland, D. W., 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* v. 279 p. 514–519.

Owens, D. W., and Lane, E. B., 2004. Keratin mutations and intestinal pathology. *J. Pathol.* v. 204 p. 377–385.

Irvine, A. D., and McLean, W. H. I., 1999. Human keratin diseases: The increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype–genotype correlation. *Br. J. Dermatol.* v. 140 p. 815–828.

Omary, M. B., Coulombe, P. A., and McLean, W. H. (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N. Engl. J. Med.* v. 351 p. 2087–2100.

研究

Bonifas, J. M., Rothman, A. L., and Epstein, E. H., Jr., 1991. Epidermolysis bullosa simplex: Evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* v. 254 p. 1202–1205.

Coulombe, P. A., Hutton, M. E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A. S., and Fuchs, E., 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell* v. 66 p. 1301–1311.

Lane, E. B., Rugg, E. L., Navsaria, H., Leigh, I. M., Heagerty, A. H., Ishida–Yamamoto, A., and Eady, R. A., 1992. A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature* v. 356 p. 244–246.

Owens, D. W., Wilson, N. J., Hill, A. J., Rugg, E. L., Porter, R. M., Hutcheson, A. M., Quinlan, R. A., van Heel, D., Parkes, M., Jewell, D. P., et al., 2004. Human keratin 8 mutations that disturb filament assembly observed in inflammatory bowel disease patients. *J. Cell Sci.* v. 117 p. 1989–1999.

Ku, N. O., Gish, R., Wright, T. L., and Omary, M. B., 2001. Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *N. Engl. J. Med.* v. 344 p. 1580–1587.

9.5 中间纤维在神经、肌肉以及结缔组织中经常表现为重叠表达

综述

Magin, T. M., Reichelt, J., and Hatzfeld, M., 2004. Emerging functions: Diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* v. 301 p. 91–102.

Al–Chalabi, A., and Miller, C. C., 2003. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* v. 25 p. 346–355.

Cairns, N. J., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q., 2004. The cytoskeleton in neurodegenerative diseases. *J. Pathol.* v. 204 p. 438–449.

Lane, E. B., and Pekny, M. (2004). Stress models for the study of intermediate filament function. *Methods Cell Biol.* v. 78 p. 229–264.

研究

Hesse, M., Magin, T. M., and Weber, K., 2001. Genes for intermediate filament proteins

and the draft sequence of the human genome: Novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J. Cell Sci.* v. 114 p. 2569–2575.

Balogh, J., Merisckay, M., Li, Z., Paulin, D., and Arner, A., 2002. Hearts from mice lacking desmin have a myopathy with impaired active force generation and unaltered wall compliance. *Cardiovasc. Res.* v. 53 p. 439–450.

Weisleder, N., Taffet, G. E., and Capetanaki, Y., 2004. Bcl–2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 101 p. 769–774.

Pekny, M., Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallen, A., Perlmann, T., Lendahl, U., Betsholtz, C., Berthold, C. H., and Frisen, J. 1999. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J. Cell Biol.* v. 145 p. 503–514.

9.6 核纤层蛋白中间纤维强化核膜

综述

Mattout, A., Dechat, T., Adam, S. A., Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., 2006. Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 18 p. 335–341.

Mounkes, L., Kozlov, S., Burke, B., and Stewart, C. L., 2003. The laminopathies: Nuclear structure meets disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 13 p. 223–230.

Smith, E. D., Kudlow, B. A., Frock, R. L., and Kennedy, B. K., 2005. A–type nuclear lamins, progerias and other degenerative disorders. *Mech. Ageing Dev.* v. 126 p. 447–460.

Broers, J. L., Ramaekers, F. C., Bonne, G., Yaou, R. B., and Hutchison, C. J., 2006. Nuclear lamins: Laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol. Rev.* v. 86 p. 967–1008.

Broers, J. L., Hutchison, C. J., and Ramaekers, F. C., 2004. Laminopathies. *J. Pathol.* v. 204 p. 478–488.

Zastrow, M. S., Vlcek, S., and Wilson, K. L., 2004. Proteins that bind A–type lamins: Integrating isolated clues. *J. Cell Sci.* v. 117 p. 979–987.

研究

Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M., and Weber, K., 1998. Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J. Mol. Evol.* v. 47 p. 751–762.

Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L., and Burke, B., 1999. Loss of A–type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* v. 147 p. 913–920.

Vergnes, L., Peterfy, M., Bergo, M. O., Young, S. G., Reue, K., 2004. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 101 p. 10428–10433.

9.7 各种晶状体纤维蛋白在进化上都具有保守性

综述

Perng, M. D., Sandilands, A., Kuszak, J., Dahm, R., Wegener, A., Prescott, A. R., and Quinlan, R. A., 2004. The intermediate filament systems in the eye lens. *Methods Cell Biol.* v. 78 p. 597–624.

研究

Zimek, A., Stick, R., and Weber, K. (2003). Genes coding for intermediate filament proteins: Common features and unexpected differences in the genomes of humans and the teleost fish *Fugu rubripes*. *J. Cell Sci.* 116, 2295–2302.

Conley, Y. P., Erturk, D., Keverline, A., Mah, T. S., Keravala, A., Barnes, L. R., Bruchis, A., Hess, J. F., FitzGerald, P. G., Weeks, D. E., Ferrell, R. E., and Gorin, M. B., 2000. A juvenile-onset, progressive cataract locus on chromosome 3q21-22 is associated with a missense mutations in the beaded filament structural protein-2. *Am. J. Hum. Genet.* v. 66 p. 1426–1431.

Sandilands, A., Prescott, A. R., Wegener, A., Zoltoski, R. K., Hutcheson, A. M., Masaki, S., Kuszak, J. R., and Quinlan, R. A., 2003. Knockout of the intermediate filament proteins CP49 destabilises the lens fibre cell cytoskeleton and decreases lens optical quality, but does not induce cataract. *Exp. Eye Res.* v. 76 p. 385–391.

9.8 中间纤维亚基以高亲和力组装为抗张力结构

综述

Fuchs, E., and Cleveland, D. W., 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* v. 279 p. 514–519.

Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U., and Magin, T. M., 2003. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int. Rev. Cytol.* v. 223 p. 83–175.

研究

Crick, F. H. C., 1952. Is alpha–keratin a coiled coil? *Nature* v. 170 p. 882–883.

Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P., and Schliwa, M.,1991. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J. Cell Biol.* v. 113 p. 155–160.

Ma, L., Xu, J., Coulombe, P. A., and Wirtz, D., 1999. Keratin filament suspensions show unique micromechanical properties. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 19145–19151.

9.9 转录后修饰调控中间纤维蛋白的构型

综述

Coulombe, P. A., and Omary, M. B., 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 110–122.

Omary, M. B., Ku, N. O., Liao, J., and Price, D., 1998. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell. Biochem.* v. 31 p. 105–140.

Omary, M. B., Ku, N. -O., Tao, G. Z., Toivola, D. M., Liao, J., 2006. 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: Multiple sites and functional insights. *Trends Biochem.* Sci. v. 31 p. 383–394.

研究

Inagaki, M., Gonda, Y., Matsuyama, M., Nishizawa, K., Nishi, Y., and Sato, C., 1988. Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly–disassembly of desmin. *J. Biol. Chem.* v. 263 p. 5970–5978.

Ku, N.–O., Fu, H., and Omary, M. B., 2004. Raf–1 activation disrupts its binding to keratins during cell stress. *J. Cell Biol.* v. 166 p. 479–485.

9.10 中间纤维的结合蛋白是偶发的而非必需的

综述

Rezniczek, G. A., Janda, L., and Wiche, G., 2004. Plectin. *Methods Cell Biol.* v. 78 p. 721–755.

Ruhrberg, C., and Watt, F. M., 1997. The plakin family: Versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 7 p. 392–397.

Hudson, T. Y., Fontao, L., Godsel, L. M., Choi, H. J., Huen, A. C., Borradori, L., Weis, W. I., and Green, K. J. (2004). In vitro methods for investigating desmoplakin–intermediate filament interactions and their role in adhesive strength. *Methods Cell Biol.* v. 78 p. 757–786.

研究

Janda, L., Damborsky, J., Rezniczek, G. A., Wiche, G., 2001. Plectin repeats and modules: Strategic cysteines and their presumed impact on cytolinker functions. *Bioessays.* v. 23 p. 1064–1069.

Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P., McLean, W. H., 2006. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat. Genet.* v. 38 p. 337–342.

9.11 中间纤维基因贯穿于整个多细胞动物进化

研究

Erber, A., Riemer, D., Bovenschulte, M., and Weber, K., 1998. Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J. Mol. Evol.* v. 47 p. 751–762.

Karabinos, A., Zimek, A., and Weber, K., 2004. The genome of the early chordate *Ciona intestinalis* encodes only five cytoplasmic intermediate filament proteins including a single type I and type II keratin and a unique IF–annexin fusion protein. *Gene* v. 326 p. 123–129.

Zimek, A., Stick, R., and Weber, K., 2003. Genes coding for intermediate filament proteins: Common features and unexpected differences in the genomes of humans and the teleost fish *Fugu rubripes*. *J. Cell Sci.* 116, 2295–2302.

赵和平　译

第 5 篇　细胞分裂、凋亡与癌症

第 10 章　有丝分裂

第 11 章　细胞周期调控

第 12 章　细胞凋亡

第 13 章　癌症——原理和概述

第10章 有丝分裂

Conly Rieder
Wadsworth Center, NYS Department of Health, Albany, NY

本章概要

10.1 导言

关键概念

- 所有细胞都是其他细胞通过称为“有丝分裂”的过程而分裂产生的。
- 有丝分裂发生在细胞完成染色体复制之后，染色体被分为两个相等的部分，然后细胞在两组染色体间一分为二，形成两个新细胞。
- 有丝分裂的差错对新细胞来说是灾难性的事件，在细胞进化中有相应的机制保障有丝分裂的精确性。

细胞的繁殖可能是细胞最基本的活动了：细胞分裂的能力是生命赖以存在的基础。在单细胞生物中，分裂即为生殖。在复杂的多细胞生物中，细胞分裂不仅是发育和生长所需要的细胞繁殖过程，而且为细胞生死更替所必需。

“细胞”（cell）一词是罗伯特•胡克（Robert Hooke）于1665年提出的，用来描述在显微镜下看到的软木栓薄切片中空心的立方形小孔。大约175年后，进一步的显微观察有了新进展——施莱登（M. J. Sehleiden）和施旺（T. A. H. Schwann）认识到细胞是生命的基本结构模块，并提出“细胞学说”。在这一伟大的里程碑作为19世纪科学领域的共识而被广泛接受的同时，下一个逻辑性的问题摆在眼前：新的细胞是怎样形成的？虽然有人认为新细胞是自然发生的，但1855年德国物理学家魏尔啸（Virchow）则主张“细胞源于细胞”（*omnis cellula cellula*），即一切细胞均为先前存在过的亲代细胞的后代。

随着19世纪末复合显微镜的发明和广泛使用，对细胞分裂过程中发生的各种事件的描述进展迅速。1879年，德国解剖学家弗莱明（Walther Flemming）提出了**“有丝分裂”（mitosis）**一词，用来描述经历分裂的蝾螈（salamander）细胞核中配对的索状物的形成（在希腊语中，“*mito*”就是“线”、“索”的意思）。他描述了细胞分裂中的一系列变化。这些索状物是由细胞核中的一种被弗莱明称之为**染色质（chromatin）**的物质形成的，它们就是我们知道的**染色体（chromosome）**（在希腊语中，“*chroma*”就是“颜色”，“*soma*”就是“体”的意思）。弗莱明注意到，在有丝分裂的早期阶段，每一条染色体都由两条等同的索状物组成，即**染色单体（chromatid）**，它们沿着长轴紧贴在一起。在高等生物中，每一条染色体都包含一个小的但很明显的区域，称为主缢痕（primary constriction）或**着丝粒（centromere）**，在此处染色体变得很狭窄，见图10.1。在同一个生物体当中，细胞内染色体的数目是相同的，而且对于同一个物种来说这一数目也都是一样的；在不同物种当中，染色体的数目是不同的，而有的物种的染色体数目是其他物种的许多倍。

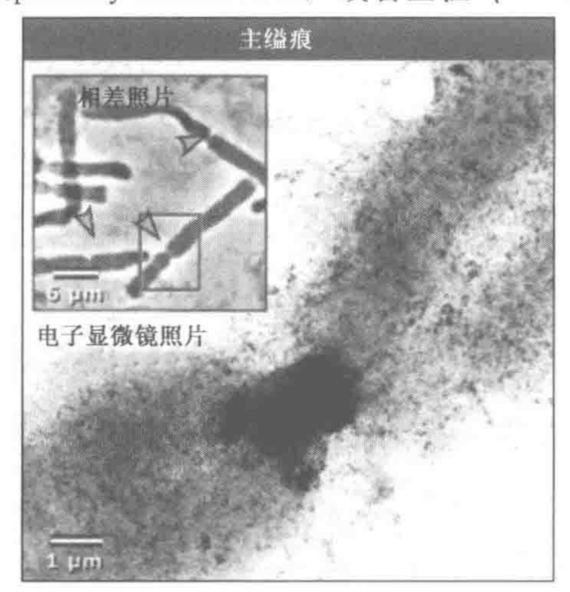


图10.1　小插图显示生活的蝾螈细胞中的几个完整的中期染色体。特定位点的每一个沟陷称为一个主缢痕。电子显微镜照片显示一条单一染色体主缢痕的高度放大图像。主图由加拿大Calgary大学的Jerome B. Rattner惠赠，小插图© 由Wadsworth中心的Conly Rieder惠赠。

早在1880年，弗莱明就认为所有细胞的繁殖均通过“核物质变形为索状物”得以实现。到1883年，海胆卵受精观察结果证实卵子和精子向胚胎贡献了相同数目的染色体。两年后，人们了解到一个有机体中所有的细胞核都是由通过精卵细胞核融合后在胚胎中形成的一个单一细胞核的重复分裂产生的。这样，至1885年，人们证实了每一个细胞都包含来自双亲的染色体。这一结论将施莱登-施旺的细胞学说（1838）和达尔文（C. Darwin）的进化论（1859）结合在一起。随后因为发现了染色体包含了细胞的基因（传递代与代间特性的单位），这一结合的本质意义真正体现出来。

除了精卵细胞外，生物体内的所有细胞均

为**二倍体**（**diploid**，di=2），其中包含了每种染色体的两个拷贝——一个通过卵子来自母亲，另一个通过精子来自父亲（人类的细胞具有 23 对染色体，使得细胞中染色体的总数达到 46 条）。有丝分裂的意义在于在细胞世代更替中保持其中染色体的二倍性。由于精子和卵子是**单倍体**（**haploid**），因此它们只包含普通组织细胞中一半数目的染色体；它们不能通过有丝分裂产生。相反，这些特殊的细胞（称为**配子**，**gamete**）的形成途径是被称为**减数分裂**（**meiosis**）的过程，见图 10.2。在减数分裂中，各包含每种染色体单一拷贝的 4 个单倍体细胞从一个前体细胞产生。这种染色体数目的减少，源于染色体像有丝分裂中那样只复制一次但细胞却分裂两次。减数分裂不像一般的有丝分裂，它的意义在于在有机体不断产生的过程中，维持生物世代更替中细胞内染色体的二倍性。在实际中，有丝分裂和减数分裂包含许多相同的机理，所不同的是在分裂起始时染色体的组织方式。

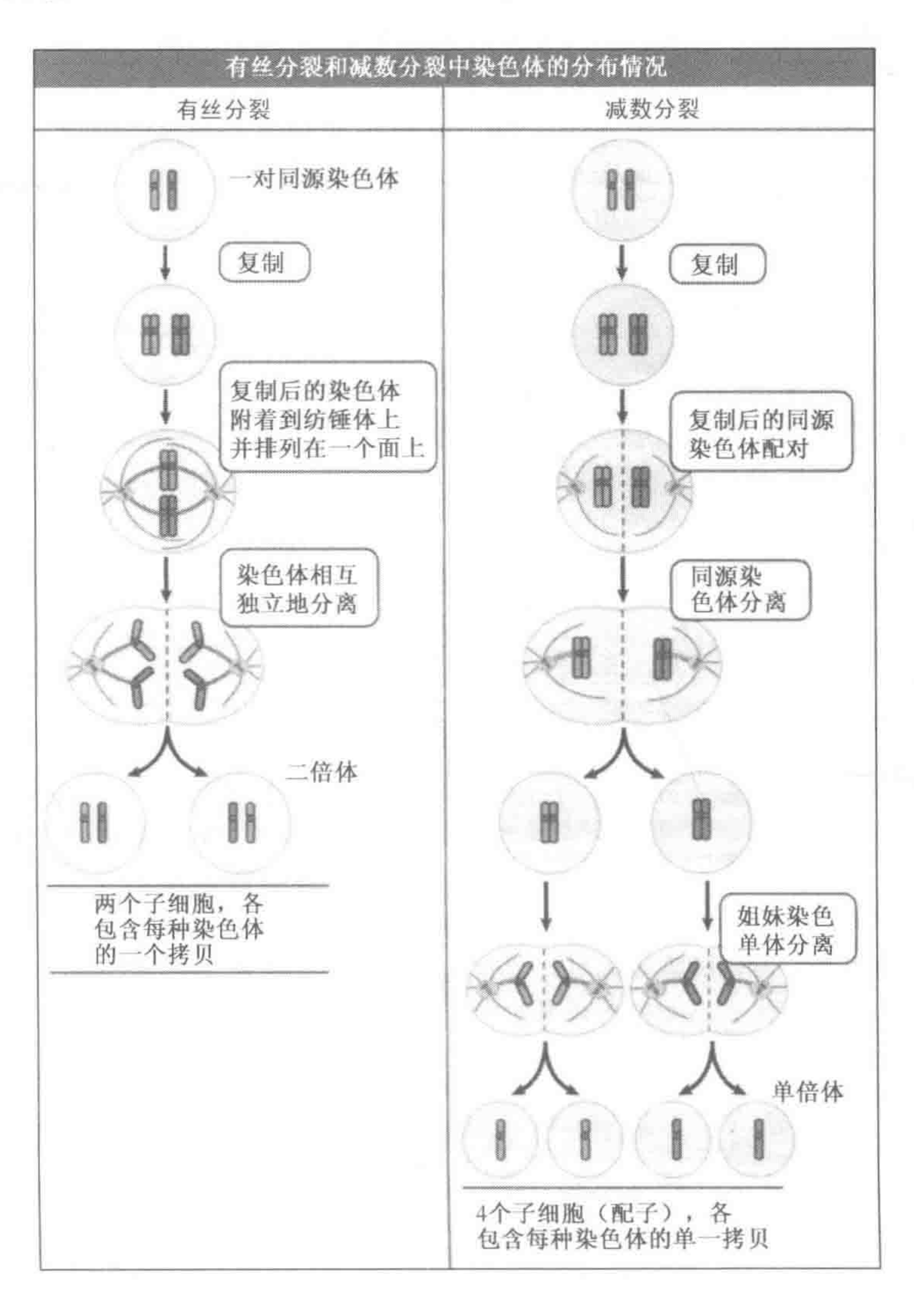


图 10.2　减数分裂包括两个连续的分裂过程。第一次分裂将同源染色体分开，第二次分裂将每条染色体的两条染色单体分开。在有丝分裂中，只有染色单体分开。

本章将集中讨论在高等动物（特别是脊椎动物）中有丝分裂是如何进行的。尽管不同生物中有丝分裂的细节会有所差异，但在所有细胞中其基本过程是相似的。在高等动物中，在临近分裂的细胞中首先可以见到的标志事件是细胞核中染色体的复制。一旦完成复制而浓缩的染色体准备完毕，包围在细胞核外的核膜就崩解了，染色体随即分散于细胞质当中。在下一步，染色体附着在称为**纺锤体**的亚细胞结构上。纺锤体名称的由来源于它很像两个圆椎体在其最宽的端部结合在一起。这种称为纺锤体的有丝分裂装置负责产生一种张力，驱动染色体运动，并对染色体的运动起导向作用。一旦在纺锤体上发生附着，染色体就逐渐向着纺锤体中部平面排列，这一平面就是赤道板。有丝分裂的完整步骤开始于染色体浓缩，随即浓缩的染色体有序地排列。

当所有染色体完成了在赤道板上的排列后，每条都从纵向劈裂为二（即染色单体分离），所产生的两组分离的染色体分别向两极运动，其运动指向纺锤体的两个相对的极点，即**纺锤体极（spindle pole）**。最后，两组分开的染色体都发生凝集，各由新生的核膜包围着，细胞两极的多个微小核物质都融合成一个大核，于是产生了两个独立的子细胞核。随着时间的推移，有丝分裂的概念逐渐扩展，将**胞质分裂（cytokinesis）**也包括进去了。胞质分裂就是在细胞核分裂完成之后，细胞质所进行的包含一系列事件的分裂过程。



图 10.3　一例唐氏综合征患者的某个细胞中的有丝分裂染色体组成。不同的染色体可以通过其主缢痕的部位、染色体大小和染色体上明暗相间的条纹分布状况来辨别。图中可见第 21 号小型染色体有 3 个拷贝。照片由 Wadsworth 中心的 Ann Wiley 惠赠。

虽说细胞分裂中染色体的分离是一种高保真的事件，差错却仍然难以避免。有丝分裂和减数分裂中的错误可以发生在好几个阶段，造成细胞的染色体过少或过多。这种状况称为**非整倍性（aneuploidy）**，其结果（非整倍化程度）取决于生物体的差别和细胞分裂错误发生的时间。当非整倍化发生在配子形成过程（减数分裂）时，就将导致胚胎出现出生缺陷综合征（birth defect syndrome），其所有细胞至少多出或缺少一条染色体。人类的一个非整倍体例子是唐氏综合征（Down syndrome），在其个体中所有细胞都多余一条 21 号染色体，如图 10.3 所示。不过在大多数情况下，非整倍体往往造成个体发育完成前的夭折。相反，如果在个体发育的进程中发生了非整倍化事件，就会形成**嵌合体（mosaic organism）**，其中不同组织的细胞包含的染色体数目不一样。最后需要指出的是，可靠的证据表明，成体中非整倍化细胞的形成是某些癌症的诱发因素。

因为等同的染色体分布对于一个生物体的生存来说是必不可少的，所以在有丝分裂中包含了增强分裂事件准确性的独特过程。在所有生物体中，细胞分裂中染色体分离的准确性通过**检验点调控（checkpoint control）**来提高。检验点是一种生物化学途径，在细胞分裂中某一特定事件完成或得以校正前阻止或延迟分裂的进程。高度精确性的需求

还反映在多种途径对实现一个相同目的的保障，只要这一目的涉及纺锤体形成或染色体移动。尽管有丝分裂总是按照上述程序按部就班地进行，也还是存在一些不同的途径以便完成更加关键的过程。最近才发现的这种生物学机理上的多重性增加了有丝分裂层面上的复杂性，但同时也给予其一定的可塑性，使得生物体能够撤除原本可能造成错误的条件。

10.2 有丝分裂是一个分阶段事件

关键概念

- 有丝分裂是一个分阶段事件，阶段的划分依据的是染色体位置及其行为特征。
- 有些阶段转变过程为细胞周期事件所必需，并且是不可逆转的过渡进程。

有丝分裂的发生包括两个分离的、不同的过程的起始和完成。其中第一个有时称为**核分裂（Karyokinesis）**（希腊语中 *karyo*＝nut，核；*kinesis*＝division，分裂），其间完成复制的染色体发生分离，进入两个不同的子细胞核。在有丝分裂的第二个过程——胞质分裂中，细胞质在这两个新生细胞核之间的区域分裂开，形成两个相互独立的子细胞。在有丝分裂的研究历史中，人们根据其进程中染色体的结构特征和所处的位置将其分解为几个阶段。对有丝分裂之类的复杂系列事件进行阶段分析是非常有用的，因为其中包括了细胞内所发生的一些过渡性、标志性的不可逆变化。大多数这样的变化依赖于特定的酶的活化或失活，而且有时候还需要特殊蛋白质（这些蛋白质在细胞分裂中起到至关重要的作用）的定时性降解。对有丝分裂之类的复杂的系列事件进行阶段分析之所以非常有用，还因为无论是纺锤体还是染色体在阶段之间都有行为表现的转变，这意味着每一个阶段都具有分子水平上的特定机理。下面，我们在细节上对有丝分裂各阶段进行讨论。

当细胞迫近分裂时，首先可见的标志性事件是细胞核中凝集的染色体的出现。这一事件起始了分裂的**前期（prophage）**。在包含巨大染色体的冷血动物（例如蝾螈、蚱蜢）中，这一阶段要持续好几小时；在包含较小染色体的温血动物（例如小鼠、人）中，这一阶段所持续的时间可能短至不足 15min。在前期的某些时间点，细胞内发生着驱使有丝分裂运行的生物化学变化。在达到这个**不可逆转时间点**之前，染色体凝集状态可能因对细胞有害的物理或化学诱因而逆转。

前期的另一个普遍标志是**中心体（centrosome）**的出现。在许多前期细胞中，两个这种细胞器在细胞质中得以显现，它们是由一片透亮的区域环绕着的小型点状物。我们将会认识到，中心体在纺锤体形成中发挥了重要的作用——不仅确定了纺锤体的两极，而且起到纺锤体结构组成中**微管（microtuble）**的成核作用。

细胞有丝分裂的驱动，需要一些蛋白质加上磷酸基团、另一些蛋白质去掉磷酸基团。已知激酶（kinase）和磷酸酶（phosphatase）分别完成了对这样的磷酸化（phosphorylation）和去磷酸化（dephosphorylase）反应的催化。在细胞有丝分裂过程中，最重要的激酶是 **CyclinB/CDK1** 复合体。这种酶被认为是有丝分裂的主控调节因子，因为当它被注射到细胞当中时，有丝分裂就被诱导发生了（这种激酶和它的调控机制的发现是 2001 年诺贝尔生理学或医学奖的颁奖主题）。在临近有丝分裂前期末尾时，CyclinB/CDK1 以一种失活状态在细胞核中积累起来。稍后，另一种酶——cdc25 磷酸酶——进入细胞核，在核中它活化了 CyclinB/CDK1。CyclinB/CDK1 一旦被激活，就去催化许多细胞核蛋

白的磷酸化，包括那些为细胞核周围包裹的膜提供结构支持的蛋白质。结果，这些蛋白质失去了与核膜的结合，导致细胞核膨大直到其周围包裹的核膜崩解。

核膜的崩解标志了有丝分裂**前中期（prometaphase）**的开始。在这一阶段中，染色体与两个中心体和联系它们的微管阵列相互作用形成纺锤体。在染色体与纺锤体发生附着时，它们将经历一系列复杂的运动，称为**中板集合（congression）**。在中板集合中，染色体朝向或背离纺锤体极移动，每条染色体相对于其他染色体独立地运动，先是朝向一极，而后又朝向另一极，经常要反复进退若干次才完成移动过程。最后，这样的运动导致所有染色体完成中板集合而到达一个处于纺锤体赤道（两极之间的中央位置）的平面或“板”上。在大多数细胞中，前中期是有丝分裂中历时最长的阶段，因为它要持续到所有染色体在赤道板区域得以定位。这一阶段可能在胚胎中只经历几分钟，但又可能在十分扁平的组织细胞中延续长达好几小时。

一旦所有染色体临近纺锤体赤道板，细胞就被认为进入了**中期（metaphase）**。中期可持续不同的时间长度，这要看细胞的种类。令人惊讶的是，将细胞带入这个时间点的复杂事件却是可逆的。当用能解聚微管的药物（如秋水仙酰胺或 nocodazole）或其他作用因素（如冷处理或高压处理）进行处理，破坏了处于中期或前中期的细胞的纺锤体之后，一旦处理停止纺锤体就将重新形成，染色体也再次进行中板集合。纺锤体在中期的解聚阻止细胞周期的进行，在实验中常常用来产生被认为“**阻断在中期（blocked at metaphase）**”的细胞。其实这些细胞是处于前中期状态，因为它们的凝集染色体在整个细胞质中分散着（微管的细节见第 7 章*微管*）。

在中期末尾，当每条染色体的两条姐妹染色单体分开时，有丝分裂的**后期（anaphase）**即开始。尽管每一条染色体都在有丝分裂之前进行了复制，组成它的两条染色单体却只是在中期结束前的时刻才可被辨别出是相互区分的单位。在实时影像显示的过程中，染色单体的分离似乎是一个突然发生的进程，而且所有染色体的这一行为是同时发生的，但实际上分离过程通常要持续几分钟并且各条染色体间有略微的时间差异。在后期起始时期染色单体的分离标志了有丝分裂的另一个不可逆转的时间点，它与将两条染色单体“胶连”在一起的蛋白质的降解和驱动细胞进入有丝分裂进程的主导性调节激酶的降解相协调（见第 11 章 *细胞周期调控*）。当姐妹染色单体相互分离后，它们便相互远离，各自朝着相对的纺锤体极运动。这种运动的产生决定于两种不同的机制。在**后期 A（anaphase A）**，每一条染色单体和它联系的纺锤体极间的距离缩小；同时，两个相对的纺锤体极相距越来越远，拉动它们联系的两组染色体相互远离，这就是纺锤体延伸过程或称为**后期 B（anaphase B）**。在两组染色体远离的同时，纺锤体开始解聚（去组装），在动物细胞中可以看到一些新的结构在它们之间形成，称为**干体（stem body）**或**纺锤线干体**。

有丝分裂的最后阶段称为**末期（telophase）**（在希腊语中，*telo*=end，末端），开始于染色体在其接近的极部形成新细胞核时。在刚进入末期、相邻的后期染色体尚未完成与纺锤体微管相连接时（在大型细胞中可以看到），染色体各自形成自己的小核。然后这些小核相互融合，形成一个大的、单一的细胞核。在末期进行中，还开始了将细胞分裂为两个子细胞的事件。最初，细胞表面周围在对应于中期染色体所排列的细胞板位置先形成一个细胞沟。细胞沟所在的这个位置也是两个新生细胞核之间的中央位置，将干体包围起来。分裂沟一旦形成便逐渐收缩，大体上将细胞分成相等的两个瓣状部分，这

一过程就是胞质分裂。在细胞沟收缩的同时，干体也聚集在一起，形成一束致密的结构，叫做**中体**（**midbody**），这也是连接两个子细胞的最后一个结构。末期事件需要cyclinB/CDK1的失活，这也是细胞离开有丝分裂状态的信号。

将有丝分裂作为由一系列阶段组成的事件进行讨论，并观察活细胞或经过固定的细胞的照片，可以在某种程度上使整个过程作为由相对静态的、相对不连续的阶段连接起来的事件。然而，事实上它是一个连续的、具有高度动力学特征的过程，有时只能作为细胞分裂的完整情景通过动态摄影来观察。

10.3 有丝分裂需要纺锤体（一种新型亚细胞装置）的形成

关键概念

- 染色体被有丝分裂纺锤体的作用所分离。
- 纺锤体是一种对称的两极结构，由在两极间延伸的微管组成，每一个极部有一个中心体。
- 染色体通过其动粒和纺锤体微管的相互作用而与纺锤体连接。

纺锤体是一种复杂的动态结构，在细胞分裂开始时突然出现，而又在分裂过程完成后迅速消失。纺锤体是有丝分裂所必需的结构，发挥两方面功能：①在核分裂（karyokinesis）中负责将复制的染色体分离到两个子细胞核当中；②发挥细胞质分裂（cytokinesis）过程的指令作用。当纺锤体的形成受到阻碍时（如细胞受到各种药物处理时），染色体仍然凝集，但不能像正常有丝分裂那样进行任何运动，有丝分裂进程被阻止。在很大程度上，纺锤体是一种生物学机构，将化学能量转化为机械能量，驱动染色体运动和细胞分裂。当然，它的功能是其结构的反映。具有两个极的纺锤体对称结构是有丝分裂能够成功进行的关键。事实上，它确立了细胞分裂的"二分"（two-ness）特性——一个细胞和其中复制的DNA被分为两个等份，进入两个分离的子细胞当中。

纺锤体可以从几个方面进行研究。纺锤体的基本结构单元微管太细微，以致在光学显微镜下不能观察到（换句话说，它们在光镜下不可分辨）。因此，在传统的光学显微镜下，虽然常常能够观察到高等动物细胞中浓缩的染色体，但纺锤体却不能观察到。然而，在许多细胞中纺锤体的形态可以被推断出来，因为它们排开了其所占据的空间中可见的细胞器。这种现象使得纺锤体比其周围的其他细胞质部分显得更为透亮。虽然科学家很早就猜测纺锤体是由纤维状物质组成的，但这一推测直到20世纪50年代才被证实。此时，偏光显微镜的运用使得纺锤体能够在生活的细胞中被观察到。自20世纪70年代起，人们发展了强大的荧光标签技术，使得纺锤体的组成成分在三维水平得以观察，甚至扩展到活细胞当中。在这些技术的支持下，纺锤体中一个或多个蛋白质的位置可以被确定，并且可以随着有丝分裂进程而被追踪。其中总被追踪的一种蛋白质就是管蛋白（tubulin），因为正是它形成了微管可见的实体。

当利用电子显微镜观察时，成年动物细胞的纺锤体包含3个基本的结构组分。两极的区域各有一个中心体界定。这种漂亮的细胞器的组成包括一对称为**中心粒**（**centriole**）的深染的小体和环绕其周围的弥散的、较为浅染的物质。处于两个中心体之间的是染色体，而它们在大多数生物中是处于纺锤体内的最大结构。染色体由压缩的、致密螺旋化和深染的直径为25nm的染色质纤丝组成，各有两个称为**动粒**（**kinetochore**）

（希腊文中 *kineto*＝movable，可动的；*chora*＝space，空间）的小结构（见图 10.1）附着在着丝粒上相对的两侧。一束致密的、大体平行的微管在纺锤体两极之间纵向延伸。这些纺锤体微管具有两个端点，一个通常位于极部或接近极部，另一个或游离于纺锤体内部或与一个动粒结合着。微管各从两极之一放射性地发出，使得纺锤体成为一个对称性结构，由两组相对的、有所重叠的微管阵列构成。这两组阵列各称为一个**“半纺锤体”（half-spindle）**。在大多数脊椎动物当中，半纺锤体中包含 600～700 条微管，其中 30％～40％的一端在动粒上。

除了每个半纺锤体上的微管外，其他微管自每个纺锤体极向外放射。这些微管向各个方向延伸，形成一个辐射状的阵列，称为星体（aster）。星体的中心就在纺锤体的极点。和纺锤体微管相似，**星体微管（astral microtubule）**的一端指向一个纺锤体极，而另一端位于远端的细胞质当中。在有丝分裂过程中，星体发挥着好几种作用。除了对细胞中的纺锤体进行定向、确定了胞质分裂面以外，它们还与纺锤体形成中将极部（中心体）分开和后期 B 的进行有关。

每条染色体上的两个动粒在有丝分裂进程中都起到关键的作用。它们对于染色体运动的重要性是显而易见的，因为缺乏动粒的染色体片段不能进行定向运动。与它们的功能相一致的关键的位置特征是两者相互对立的位置关系。由于分处于着丝粒两侧，它们各面向一个纺锤体极，于是使经复制的染色体联系到两极。两个动粒之间的这种位置关系对于保证两个染色单体分离到两个不同的细胞核中是必不可少的。在纺锤体形成过程中，每一个动粒与多个从两极之一发射而来的微管连接，形成一个延伸于动粒和纺锤体极的微管束，称为**动粒纤维（kinetochore fiber）**。动粒纤维和动粒并非简单地发挥了绳索和钩子的作用而使得染色单体被拖向纺锤体极部。相反，它们通过多种相互作用发挥很关键、很活跃的功能，不仅确定了染色体的运动方向，而且产生了促使染色体运动所需要的作用力。

为了理解有丝分裂分子水平上的机理，可能必然被问到的主要问题有：纺锤体是怎样形成的，它们的两极特征是怎样保证的？驱动染色体运动的力是如何产生和如何调节的？染色体正确分离的忠实性是以何种机制保障的？染色体分离完成后，细胞质是怎样分裂到两个子细胞中的？

10.4 纺锤体的形成和功能依赖于微管及其结合的马达蛋白的动力学行为

关键概念

- 纺锤体是一个由微管和微管依赖性马达蛋白组装而成的复合结构。微管是高度组织化的结构，具有极性特征。
- 纺锤体微管是高度动态的，有的表现了动态的稳定性，有的则体现为动态的亚单位更替特性。
- 微管和马达蛋白之间的相互关联产生了作用力，为纺锤体的组装所必需。

纺锤体的形成和正确的功能取决于其微管的动力学性质和微管依赖性马达蛋白（动力蛋白，motor protein）的功能两个方面。虽然微管形成了纺锤体的基本结构单元，但马达蛋白却起到了将微管组织到纺锤体中和驱动染色体运动的作用。一些马达蛋白起到了直接组装纺锤体和将其组分连接为黏合性单位的作用，另一些则负责将染色体附着于

纺锤体和产生染色体运动所需要的力。即使纺锤体被传统地认为是一个微管结构，它更确切地应当看作是由微管、马达蛋白和其他蛋白质组成的集合体。

尽管马达蛋白在产生纺锤体内部的力的方面起到了关键的作用，但微管却远远不是一个作为马达蛋白运动支架的稳定结构。在有丝分裂的始终，微管是极其动态的，而且这种特性对纺锤体组装和染色体分离都是至关重要的。

在纺锤体中，微管的组织结构体现为其极性特点。就像在第 7 章中所讨论的那样，微管的两端无论在化学上还是结构上都有区别，给予微管以结构上的“极性”，从而一个微管可以被认为是指向一个方向或另一个方向。每一个半纺锤体的微管和那些位于其结合的星体内的微管都以同样的极性排列：它们的负极端靠近极部，而正极端位于极部的远端，如图 10.4 所示。在两个极性的微管阵列交汇时，它们的微管就发生重叠，在纺锤体的中央产生一个区域，在此处，相毗邻的微管的极性相反。在每个相对的半纺锤体中，对于微管依赖性马达蛋白参与细胞分裂来说，微管指向的一致性是必要的。如果每一个半纺锤体中微管的极性是随机的，不同类型马达蛋白的分子将简单地相互对立，即使不造成净运动完全无法产生，也会使任何净运动发生混乱。

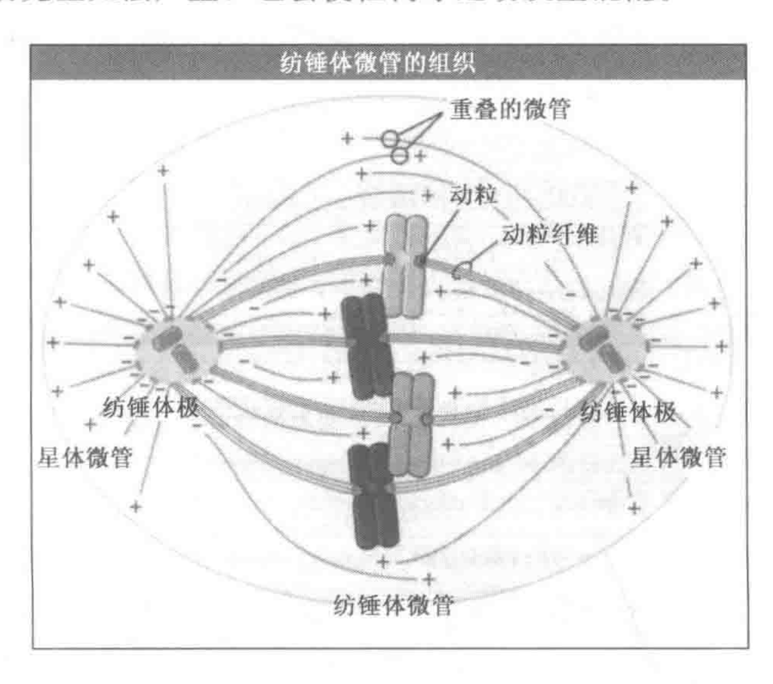


图 10.4　微管在纺锤体中的组织结构体现为其极性特点。它们都有靠近两个中心体之一的负极端和处于其远端的正极端。在纺锤体的中央，发自两个中心体的微管发生重叠，将两根极性相反的微管置于相互毗邻的位置。

在整个有丝分裂的各个阶段，微管的动力学特征都起到了重要的作用。通过研究脊椎动物的培养细胞和从非洲爪蟾（*Xenopus*）卵中的提取物，人们揭示了每个星体中的微管表现了动力学不稳定性，并且比间期细胞中的微管更短、更具有动态特征。这种差异可部分地归因于有丝分裂过程中灾难性事件发生频率的增加，此时微管的正极端被关闭，不再生长或继续处于聚合状态，而是缩短或处于解聚状态；也部分地缘于微管恢复聚合性的频率的降低，即解聚的或缩短的微管不能很好地转变回聚合或生长状态。这种动力学特性的增加发生在细胞进入有丝分裂时，因为正常的阻止灾变发生的微管结合蛋白被抑制了，而促进微管生长的其他微管结合蛋白则被活化。这种相反活性的平衡受到

主导性的有丝分裂调节激酶（cyclinB/CDK1）的调控，这种激酶在临近核膜崩解时产生活性（见 10.2 有丝分裂是一个分阶段事件）。就像下面将要讨论到的那样，细胞进入有丝分裂时微管动力学特性的增加在纺锤体组装中发挥主要作用。

当纺锤体形成时，第二种微管动力学类型便产生。此时，微管开始表现一种称为**亚基变换（subunit flux）**的行为。在这种奇特的行为方式中，管蛋白亚基在微管的正极掺入而后沿着微管迁移到负极，并随后从负极去除。亚基变换发生在纺锤体的所有微管中，但在动粒纤维中的微管内更是特别普遍，如图 10.5 和图 10.6（见图版）所示。亚基变换的起源尚不清楚，但它很可能是因为纺锤体组装中涉及的正极和负极同其他组分（如马达蛋白）的相互作用。即使是在纺锤体微管经历亚基转换时，星体微管也仍然处于动力学不稳定状态。虽然亚基转换的目的还不清楚，它似乎不仅在帮助平衡纺锤体内部的作用力方面而且在驱动染色体运动方面起着一定的作用，因而它的两个半体保持对称。

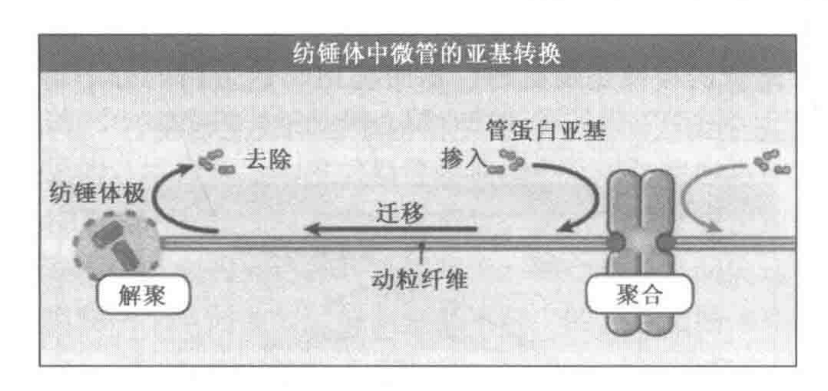


图 10.5　管蛋白亚单位不断地在动粒处掺入微管中，向着纺锤体极前进，而后从极部位置被释放掉。管蛋白如此不断地在动粒纤维的微管内部从动粒向极部迁移。在中期阶段延续过程中，只要正极装配上的亚基与负极解除的亚基数量相匹配，动粒微管的长度就会保持恒定。如果在动粒处管蛋白亚单位的装配减少，而在极部亚基的解除却没有变化，则动粒就将移动向极部。亚基转换因而可能意味着对染色体运动的推动。

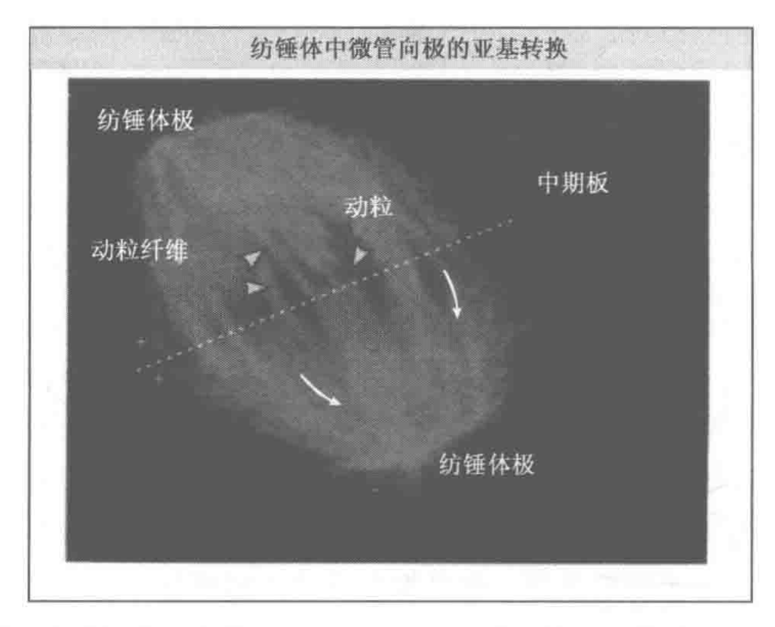


图 10.6　展现一个细胞中有丝分裂纺锤体的一段录像的第一个截屏画面。其中管蛋白的一小部分被荧光标记为绿色，动粒显示为橙色。录像显示了绿色斑点沿着整个动粒纤维的向极迁移。照片由 Ludwig 癌症研究所的 Paul Maddox 惠赠。

许多不同类型的马达蛋白与纺锤体框架发生相互作用，既有负极端定向的胞质动力蛋白（cytoplasmic dynein）也有驱动蛋白（kinesin）超家族的马达蛋白成员（其中大多数朝向一个微管的正极端移动）参与有丝分裂。纺锤体是足够复杂的结构，而马达分子天然地参与了它的形成和功能，从而在高等生物中仅在细胞分裂过程中起作用的就有超过 15 种的驱动蛋白家族成员。

在整个纺锤体中，马达蛋白随处可见，包括定位于动粒的、沿着染色体臂的、位居纺锤体极部的和顺着纺锤体极与染色体之间的微管分布的。人们发现许多类型的马达分子只有一个定位地点，但是也有些是多处存在的。例如，胞质动力蛋白就是除了存在于细胞的外层、与星体微管相互作用外，既可分布于动粒上又能够在纺锤体极部找到的。另一方面，驱动蛋白样的 CENP-E 则集中于动粒上，而染色体驱动蛋白（chromokinesin）就只能在染色体臂上觅得。

在有丝分裂过程中，马达蛋白体现了几种基本功能，见图 10.7。有的（例如胞质动力蛋白）结合到目标结构（包括动粒和质膜）上，驱动它们沿微管运动（虽然在质膜上实际上是微管在运动）；其他则有多个马达结构域组织在一起使得马达蛋白可以一次结合两根微管，将两者链接在一起。在这些马达蛋白作用的基础上，相邻的微管能够具有相同的或相反的极性。如果一个马达分子结合两个极性相反的微管，它将试图使它们相对地错开运动（滑动）以至于它们最终不再有重叠。这种情况的一个例子是驱动蛋白家族的马达分子 Eg5，它可以结合不同的微管以及它们的两端。相对的情况，如果一个马达分子在空间组织关系上是与两根同样极性的微管结合，结果将是形成相同极性微管的集合，它们在一端联系起来形成放射状的阵列（就像星体那样）。其他驱动蛋白相关

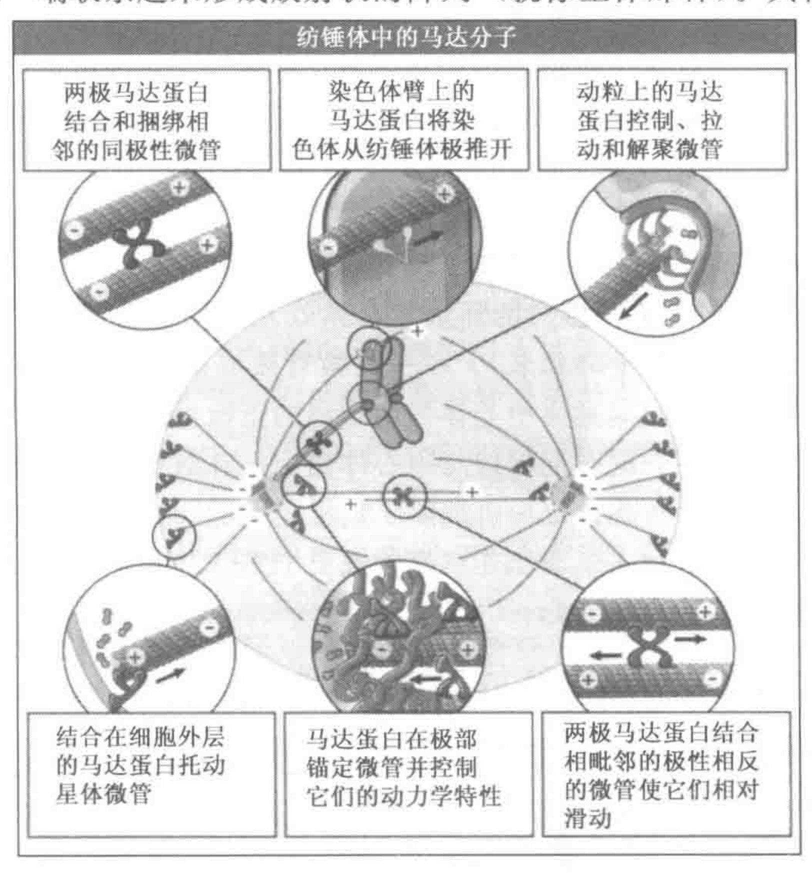


图 10.7　纺锤体与在微管上发挥功能的马达分子包装在一起。这些分子和微管之间特殊的相互作用形成了纺锤体，是它产生运动和作用力所必需的。箭头指示的是马达分子运动的方向。

蛋白不在微管上运动，而是刺激微管正极的去组装。一个很好的例子是有丝分裂着丝粒结合驱动蛋白（mitotic centromere associated kinesin，MCAK），在每一条染色体的着丝粒上都能够发现。得益于马达蛋白的这些特性和不同类型马达蛋白相互之间的定位策略，纺锤体被有机地构筑起来，驱动染色体运动的作用力得以产生。

马达分子参与纺锤体功能的方式并非总是明显的。例如在一些场合下，不同的马达分子的定位方式使它们与对方似乎是相对立的。不论这一体系的细节如何，很明显纺锤体的形成和功能需要多重必须平衡的力量，这些力量产生于在纺锤体的具动力的微管骨架结构上发挥作用的微管马达蛋白的活动。

10.5 中心体是微管的组织中心

关键概念

- 中心体确定了纺锤体极并在微管形成中发挥作用。
- 中心体发挥了微管成核作用并常常随即结合到微管的负极。

在细胞接近进行有丝分裂的时刻会发生大量的变化。在动物细胞中，最显著的情景之一是间期的长胞质微管阵列消失，代之以两组短微管放射形阵列，经常称为星体。每一个这样的放射形阵列包围着一个中心体。动物中纺锤体的形成就是随着中心体的分离从这两个星体起始的。既然两个中心体将确定纺锤体的极，极端重要的一点就是有丝分裂中出现两个而且只能有两个中心体。在两个星体相互作用以开始纺锤体的形成时，它的结构被染色体所稳定，其中主要的作用由它们的动粒所发挥的。

每一个细胞在其诞生时都只包含有单一的中心体，它在先前的分裂中确定了纺锤体的两极之一。在不分裂细胞中，这个小型细胞器正常情况下是驻留于细胞中央附近，与细胞核紧密结合。在分裂间期，中心体发挥**微管组织中心（microtubule organizing centre）**的作用，产生和组织在整个细胞中伸展的胞质微管阵列。这个阵列参与细胞质的组织和物质、细胞器在细胞内的运动。

作为微管的成核地点，中心体形成了微管的阵列。在一个中心体内，一根微管从一个包含一种叫做**γ-tubulin**的管蛋白的环形复合体处开始生长（见7.7 *细胞利用微管组织中心已成核的方式启始微管的组装*）。在一根微管被成核以后，其负极端通常保持与中心体锚定着。然后主要在其远离中心体一定距离的正极端通过新添或去除管蛋白分子得以延长或者缩短。在不同的时期保持与中心体锚定，并且在一些细胞类型中被处于其结构内部的酶所主动地释放。锚定的机制除了负极定向的马达分子外，还涉及几种结构蛋白，包括胞质动力蛋白和一个驱动蛋白家族成员HSET（基于微管的马达蛋白的细节见7.11 *基于微管的马达蛋白介绍*）。

10.6 中心体在DNA复制的相应时期得以再生

关键概念

- 中心体由两个中心粒和包围其的中心粒外周物质组成。
- 新中心体的形成需要中心粒的倍增。
- 中心粒的倍增受细胞周期控制并与DNA复制相协调。
- 中心粒的复制靠一个与每个已经存在的中心粒相邻的新中心粒的立即形成和生长来实现。

在有丝分裂过程中，存在于细胞中的每一个中心体都有形成一个纺锤体极的潜能。纺锤体正常情况下只有两极，因为进入有丝分裂的细胞通常只有两个中心体。如果一个进入有丝分裂细胞的中心体多于两个，就会产生多极纺锤体，细胞有很大的可能性产生非整倍体后代细胞。为了避免这种情况，存在着一种机制保证在一个细胞周期中中心体只复制一次。如果这种调控机制被破坏，细胞中就会产生太多的中心体，可能导致引起癌细胞和肿瘤的遗传缺陷。为了理解正常纺锤体的两极本性是如何保障的，需要研究中心体的结构和细胞对其复制的调控方式。

在大多数细胞中，光学显微镜下所看到的中心体是一个或两个点状物。为了揭示这种细胞器的细节和全面理解其结构的复杂性，电子显微镜派上了用场。利用这种工具，人们看到中心体的核心包含了一对称为中心粒的结构。每个中心粒由每圈 9 个三根一组的微管“风叶”的风轮状结构组成，每圈“风叶”均匀地排列在直径为大约 0.3μm 的圆柱的一周上。Boveri 和其他工作人员在光学显微镜下仅仅勉强可见的情况下，推测了中心粒是永久的、独立的细胞器，由先前存在的中心粒通过细胞分裂形成。的确，除了极少数例外，新的中心粒只在靠着已有的中心粒壁的位置形成。在某些细胞中，这两个中心粒之间紧密的物理关系在整个细胞周期中保持着，但是在许多细胞中，这种关系在细胞间期失去，两个中心粒在整个细胞周期中相互独立地“徘徊”。

每个中心粒与一团云状的周围物质结合，后者在电镜下是不透明的物质。**中心粒周围物质（pericentriolar material）**由大量的附着于一个骨架结构上的蛋白质组成。结果，至少在下一轮中心粒复制完成之前，老的（母）中心粒在组成上比其子中心粒含有更多的这种物质。在中心粒周围物质中包含的蛋白质中，有几种类型的微管依赖性马达分子，还有微管成核作用中利用的 γ-tubulin 环。中心粒自身包含着大量特定的结构蛋白和酶活性蛋白，它们中的一些也存在于中心粒周围物质当中。

在细胞周期的间期部分，中心体起着几种相互协调的作用。大多数细胞在 G_1 期，由母中心粒起始形成一个称为**原纤毛（primary cilium）**的细长的膜包围结构，自细胞表面发出。尽管常常被人忽略，原纤毛却是相当普遍的，我们很容易分辨出哪些细胞是缺乏原纤毛的，哪些是拥有的。在一些上皮中，这样的结构可以自基部细胞表面伸出超过 20μm 的长度。由于它们在许多转化了的细胞中不被发现，原纤毛对于细胞的生存并不是必需的，这使得科学家推测他们就像盲肠一样是简单而退化的附属物。然而，眼睛的视杆和视椎细胞的外层部分（负责光子吸收的高度特化结构）却是由原纤毛衍生来的，并且迅速积累起来的证据说明原纤毛对于适当的发育和组织功能也是需要的。

在动物细胞当中，中心粒的对数限定了中心体的个数。因此，细胞通过调节中心粒的复制来控制它们所包含的中心体的数目。有关研究刚刚开始揭示精确地控制中心粒倍增的机理，以及这种再生性是如何与细胞的核心活动（如 DNA 复制）相协调的。有证据表明，中心粒复制的时间关系受细胞质中的变化所控制，说明有一种可溶性因子调控了它们的加倍。另外，使得中心粒能够复制的条件被发现只存在于细胞周期的 S 期，此时细胞的 DNA 也在复制。中心体复制的基本调节因子似乎是 CDK2 激酶和它的 cyclinA 和 E 激活因子。这些调控因子在接近 S 期开始时发生活化，也负责使细胞进入 DNA 合成的状态（见第 11 章细胞周期调控）。共同调节 DNA 和中心粒复制起始的调控因子的事实进一步证实这两种活动是相互协调的，这样细胞进入有丝分裂时就同时能

够复制它的中心体和染色体。虽然说已经清楚中心粒的倍增是如何起始的，但其倍增如何限定从已经存在的一个中心粒只能形成单一的新中心粒还不清楚。

一旦复制过程开始，新中心粒的倍增就逐渐在两个中心粒中每一个的毗邻位置形成，同时细胞进入S期。复制后的成对中心粒中，一个称为子中心粒，是新的，因为它在前一个细胞周期形成；另一个称为母中心粒，是在更早的细胞周期形成的，携带了原纤毛。中心粒复制的第一个信号是两个原中心粒（procentriole）的出现，其中每一个都以右转角从已经存在的中心粒之一的壁处伸出。这一过程不依赖于两个原始中心粒的物理关系，因为即使将它们分开了，这种复制仍然能够发生。一旦原中心粒得以形成，它们就缓慢地延长直到在接近有丝分裂的时间达到成熟中心粒的长度。尽管母、子中心粒在形成和生长原中心粒方面是等同的，但大部分中心粒周围物质还是继续与更为成熟的母中心粒结合。在倍增过程中，子中心粒最终聚集起新的中心粒周围物质，与它组织的微管阵列在一定距离内保持联系。到晚间期，细胞包含了两个中心体，每一个由一对紧密结合的中心粒和其中心粒周围物质组成。在一些细胞中，这两个中心粒在一起保持物理联系并作为一个单元发挥作用一直到细胞进入有丝分裂；在其他细胞中，这种联系被打破，在细胞还没有任何证据进入有丝分裂之前，两个中心体就相互移开。两个中心体分离的时机和核膜崩解的关系是高度变化的，即使是那些相互邻近的、遗传上等同的细胞。

10.7 纺锤体形成于原先分开的两极星体的相互作用

在细胞经历从间期到有丝分裂期的过程中，微管的分布经历着快速而显著的变化。间期细胞中典型的长胞质微管阵列解散，两个中心体中的每一个发挥成核作用，形成由较短的微管组成的致密放射状阵列。就像图10.8所示，这些星体最终将贡献纺锤体形成所需要的微管。有丝分裂起始时微管数量和分布的变化受中心体内部和整个细胞内的其他变化两个方面的介导。

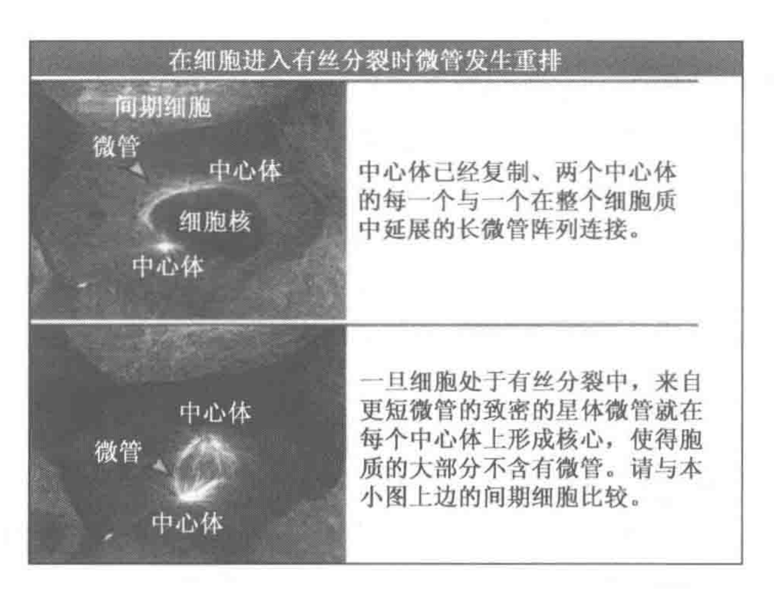


图10.8 来自一短录像的镜头，显示微管阵列转变为有丝分裂阵列。照片由Massachusetts大学（Amherst）的Patricia Wadworth惠赠。

在细胞接近进入有丝分裂状态时，两个中心体发生变化以使其能够比在间期时对更多微管发挥成核作用。在这些变化发生时，结合于中心体的蛋白质转变为高度磷酸化状态，中心体中的γ-tubulin含量增加，环绕在外围的中心粒周围物质发生扩展。这样的“成熟”过程是如何发生的还不太清楚。不过，其中很可能涉及在细胞从G2期向M期进展时特异激酶的活化，包括主导性的有丝分裂调控激酶（见第11章细胞周期调控）。

大约在同一个时间，因为胞质中的条件变化，微管变得很不稳定，就像前面讨论过的那样，这造成间期的长微管阵列被从中心体生长的短星状体阵列所取代。结果在早中期开始之前，细胞中微管的总长度减小，新微管形成和旧微管去组装的速率（周转率）增加。这意味着，在核膜开始崩解的同时，核周围的区域持续地被从每个星体生长的大量高度动态的微管所标记。就像我们将要看到的那样，这种动力学行为为星体与染色体的联系提供了条件。

在两个中心体分离的同时，自它们生长的星体微管阵列相互作用，开始形成纺锤体。纺锤体的形成是一个有显著灵活性的过程，可以通过两个途径之一发生，这要看中心体的分离是发生在核膜崩解之前还是之后，见图10.9。两个途径均要涉及微管与马达蛋白之间的相互作用。

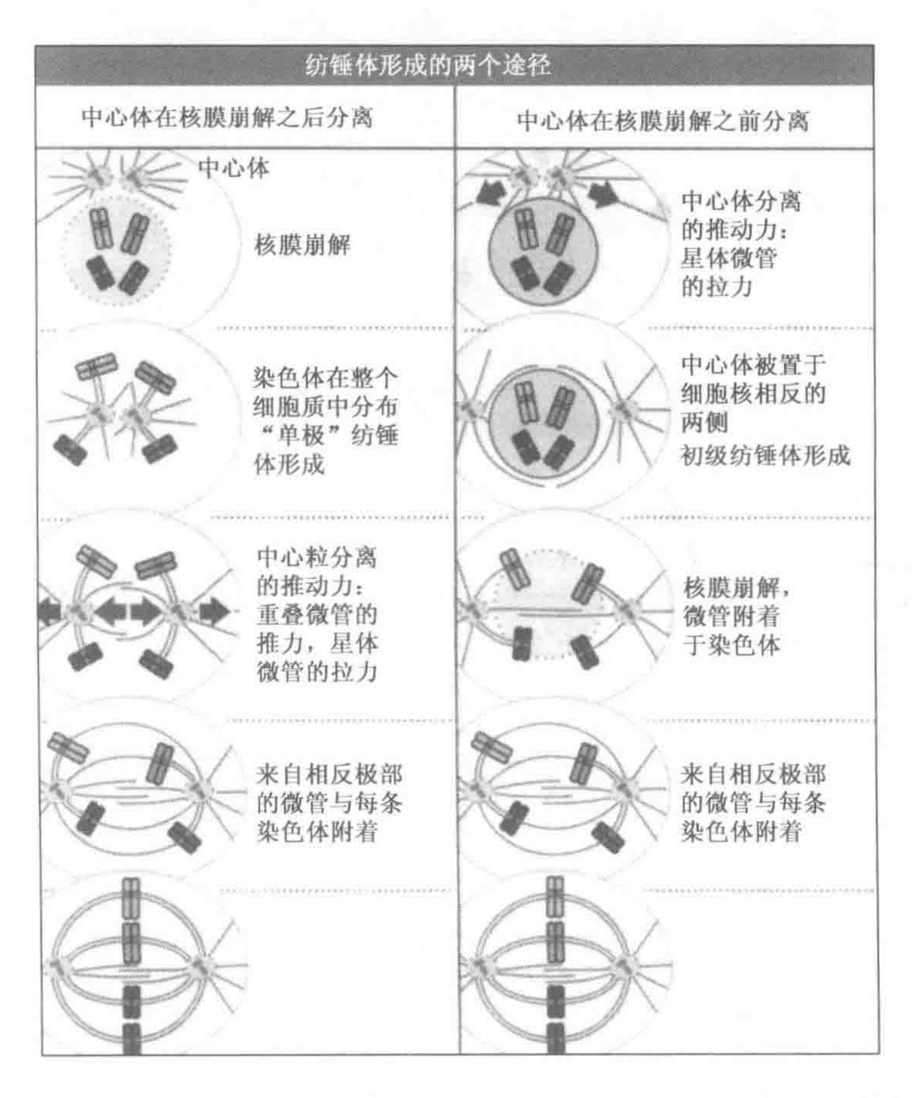


图10.9 两个途径的差别在于相对于核膜崩解中心体分离的时间。纺锤体形成的能力与中心体分离的时间无关，突出地体现了纺锤体形成过程的高度灵活性。

在核膜消失发生于中心体开始分离之前的情况下，被释放的染色体在整个细胞之中分布，并暴露给唯一的大星体。图 10.10（见图版）显示的就是“单极”纺锤体或半纺锤体形成的情况。这种“单极”纺锤体延续到中心体，最终发生分离，并将其转变为两极纺锤体。在核膜崩解之后才发生的中心体分离受两个方面力的驱动：一种力推动它们分开，源于驱动蛋白样蛋白 Eg5，通过这种蛋白与两个中心体之间极性相反的相邻微管间的相互作用；另一种力拉动它们，来自锚定在细胞周边（即处于细胞皮层）的胞质动力蛋白的活性，见图 10.11（驱动蛋白和动力蛋白的细节见 7.11 基于微管的马达蛋白介绍）。如果不出意外，这些推力和拉力必然将中心体移开，直到两个星体阵列不再重叠。然而，中心体的分离是严格地受其他与重叠的微管阵列相结合的马达蛋白限制的，而不仅仅是受到姐妹动粒上动粒微管的限制（这些动粒微管将两个中心体维系在一起。我们将在 10.8 纺锤体的稳定需要染色体但可以在无中心体的条件下“自我组装”中介绍相关内容）。

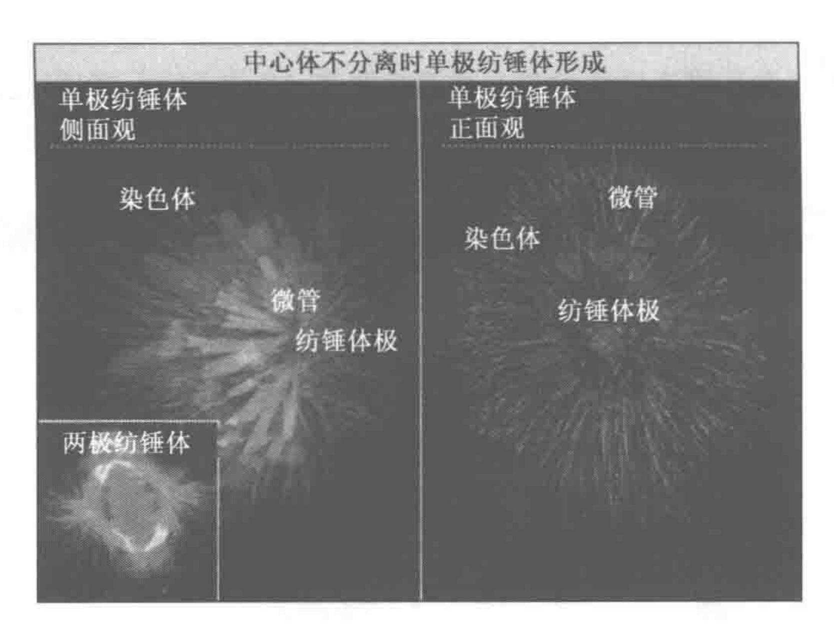


图 10.10 左图是一个单极纺锤体的侧面观，这里的单极纺锤体形成于鼠袋鼠（rat kangaroo）细胞在中心体的分离被阻止时。染色体（橙色）附着于纺锤体唯一的极区。作为对照，小插图显示了正常双极纺锤体。右边是一个极面观的人类细胞单极纺锤体图片，中心体在中央区域，呈蓝色。左边照片由 Wadsworth 中心的 Alexe Mikhailov 惠赠；照片复制自 Canman，J. C.，et al. *Nature*，August，2003. 424：1074-1078. 右边照片由北卡罗来纳大学的 J. C. Vanman 和 E. D. Salmon 惠赠。小插图照片由 Lehigh 大学的 Lynne Cassimeris 惠赠。

如果核膜崩解时两个星体已经分离，纺锤体即以两种方式形成，见图 10.8。在这种条件下，星体的分离不涉及 Eg5，因为它定位于核膜，无法获得。相反，胞质动力蛋白与自每个中心体生长的微管相互作用，能够将本来相互紧密联系的中心体拉开。在这种情况下，动力蛋白在细胞核的皮层和核膜表面均有定位。跟肌球蛋白（或者定位于中心体或者沿微管分布）相联系，肌动蛋白纤维决定了中心体移动的方向。

当两个星体在核膜崩解之前就分离时，在相应区域往往先形成一个初级纺锤体（primary spindle），在此方向相对的微管阵列相互重叠。然而，在核膜崩解之前，这个结构很不稳定，分离着的中心体微管阵列可以被拉开足够远，直到他们不再有重叠。这

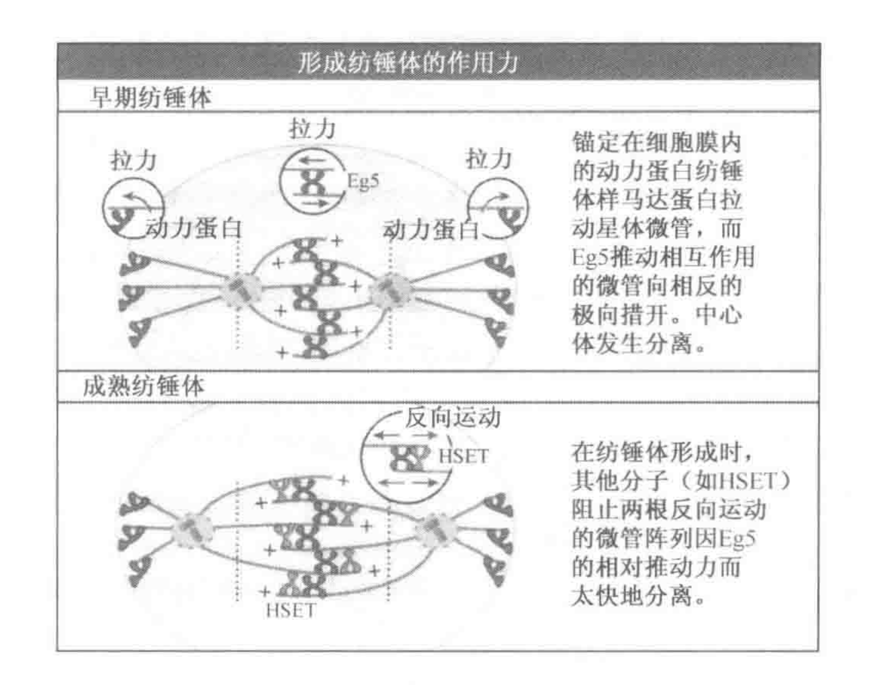


图 10.11　核膜崩解后立即开始的过程。起初两个中心体是彼此紧密靠近的。Eg5 和 HSET 都是驱动蛋白家族的微管依赖性马达蛋白，但是 Eg5 朝着微管的正极运动，而 HSET 则朝负极运动。三种马达蛋白的力学平衡决定了纺锤体的长度。

一现象的原因是，纺锤体的稳定性需要在间期隔离在细胞核之内、只在核膜崩解后释放到细胞质中的蛋白质。结果，在晚前期，两个中心体及其结合的星体分别在核的相对两侧定扎，两者之间不再有相互作用。在这样的细胞中，纺锤体只在动粒能够触及微管并将两个中心体重新牵连起来后形成。

10.8　纺锤体的稳定需要染色体但可以在无中心体的条件下“自我组装”

关键概念

- 染色体缺失时，相毗邻的星体可以完全分离，但不能形成纺锤体。
- 染色体通过其动粒与星体微管相连，这不仅稳定了纺锤体的几何结构，而且稳住其中的微管。
- 在没有中心体时，纺锤体仍能够形成，虽然这时它的形成相当缓慢并且缺乏星体微管。
- 中心体参与的纺锤体形成涉及由染色体引起的微管成核和几种不同类型的微管依赖性马达蛋白的功能。

在纺锤体形成时，它被染色体及其动粒所稳定，也被结合在微管上、将附加成分吸引到纺锤体上的分子马达所稳定。

马达蛋白将相反极性的相邻微管联系起来，对于纺锤体基本形状的确立是特别重要的。这样的微管在两个星体结构的重叠区域存在，将它们联系起来就形成了一种很像普通纺锤那样的基本形态，即使附近并没有染色体。但是，缺乏染色体联系的纺锤体是不稳定的，将逐渐丢失其微管。

染色体与诞生中的纺锤体的结合是如何阻止微管丢失的呢？答案还不确定，但是有迹象表明涉及了若干种相互有重叠的机制。染色体上的每个动粒将星体微管招募到称为动粒纤维的、将动粒与一个极点相连的微管束中（在 10.9 着丝粒是染色体上的包含动粒的特殊

区域中也有讨论)。这些微管因插入到动粒纤维中而比其他纺锤体微管增加了稳定性。这种情况在星体微管的一个很重要的组分中发生。在中期，总数1200～1500根典型纺锤体中大约有30%～40%结合到动粒上而被稳定住。由于每个染色体都有两个动粒，动粒纤维的形成将两个纺锤体极牵拉起来，使得相对极部的星体微管阵列更加密切地相互作用。

在动粒微管正在形成时，每个星体也在招募和汇集一个大范围的蛋白质群体以稳定其微管。这些蛋白质中的有些成员属于结构蛋白，组织到松散的**纺锤体基质（spindle matrix）**中——纺锤体基质是包围微管的物质（见图10.19)。例如，当核有丝分裂装置(nuclear mitotic apparatus，NuMA）蛋白自细胞核释放并被CDK1磷酸化时，它就在纺锤体内得以集中。通过与多种多样的马达分子结合，NuMA锚定和稳定了微管。基质成分对稳定性的影响十分显著，但是它的影响力跟动粒相比还是逊色的。在一个成熟的纺锤体当中，与动粒相结合的一根微管的寿命比其他纺锤体微管的寿命长10倍。

令人惊奇的是，双极纺锤体可以在没有中心体时形成。这一令人关注的过程由一个自组装程序实现，在这一程序中，随机成核的微管被染色体和微管依赖性马达蛋白组装到双极性结构中。这一**“无中心体的”（acentrosomal）**纺锤体组装路径在高等植物中被利用，也在某些动物的减数分裂和早期发育阶段被发现。一种可能性是，这种无中心体路径是进化中中心体介导的微管形成途径的祖先形式，又被中心体存在的情况所掩蔽了。这种观点是有事实依据的，即使是正常情况下包含中心体的动物组织细胞也可以在无中心体的情况下形成两极纺锤体。这是一个很好的例子，证明细胞在进化过程中是怎样通过多种机制来完成一项同样的任务的。

在无中心体的纺锤体组装过程中，短的微管通过涉及染色体表面上蛋白质的一条途径在每条染色体附近形成。这些微管起初是随机定向的，但随后在微管依赖性马达蛋白的作用下组织到平行的阵列中，如图10.12所示。马达蛋白所发挥的一个核心作用是及时与两根定向相反的微管结合并同时牵引它们朝各自的正极端移动。这些蛋白质首先简单地顺着染色体周围的微管排列，沿着微管的长度与之结合并将它们交联起来。待向每个微管的正极端移动时，这些马达蛋白将它们归到两个平行的、在其正极相遇的极性微管组中。马达蛋白可能保持结合状态，以有利于维持结构。染色体臂上的马达蛋白称为染色体驱动蛋白（chromokinesin)，也参与了这一过程。这些马达蛋白的部分作用可能是将染色体附近的微管束缚住，使它们在纺锤体形成时保留在其中央部位。一旦被分组，在两个阵列中的微管就都通过负极指向性马达蛋白（如胞质动力蛋白和HSET）在其负极端捆绑在一起。这样，整个微管阵列就获得了纺锤体所固有的性状。这种自组装过程在染色体周围独立地发生。多极性的纺锤体是这样产生的：若干个纺锤体被融合到一个大的单一纺锤体中，并拥有庞大的纺锤体极。结构蛋白和它们向微管负极（形成它们的极区）运输的其他基质成分(像NuMA那样）将整个结构胶连起来并稳定了极区。

如果中心体对于形成两极纺锤体并不是必需的，那么为什么会在大多数动物有丝分裂细胞的纺锤体极处发现它们呢？一种原因是，中心体在动力方面具有优势使得纺锤体更快地形成。这是很重要的，因为生物的发育过程中，纺锤体必须经常很快地同步形成。另一个原因是，纺锤体的极是由包含星体的中心体形成的，而星体在由无中心体路径形成纺锤体的细胞的极区是没有的。这些星体通过决定纺锤体在细胞内的定位关系而

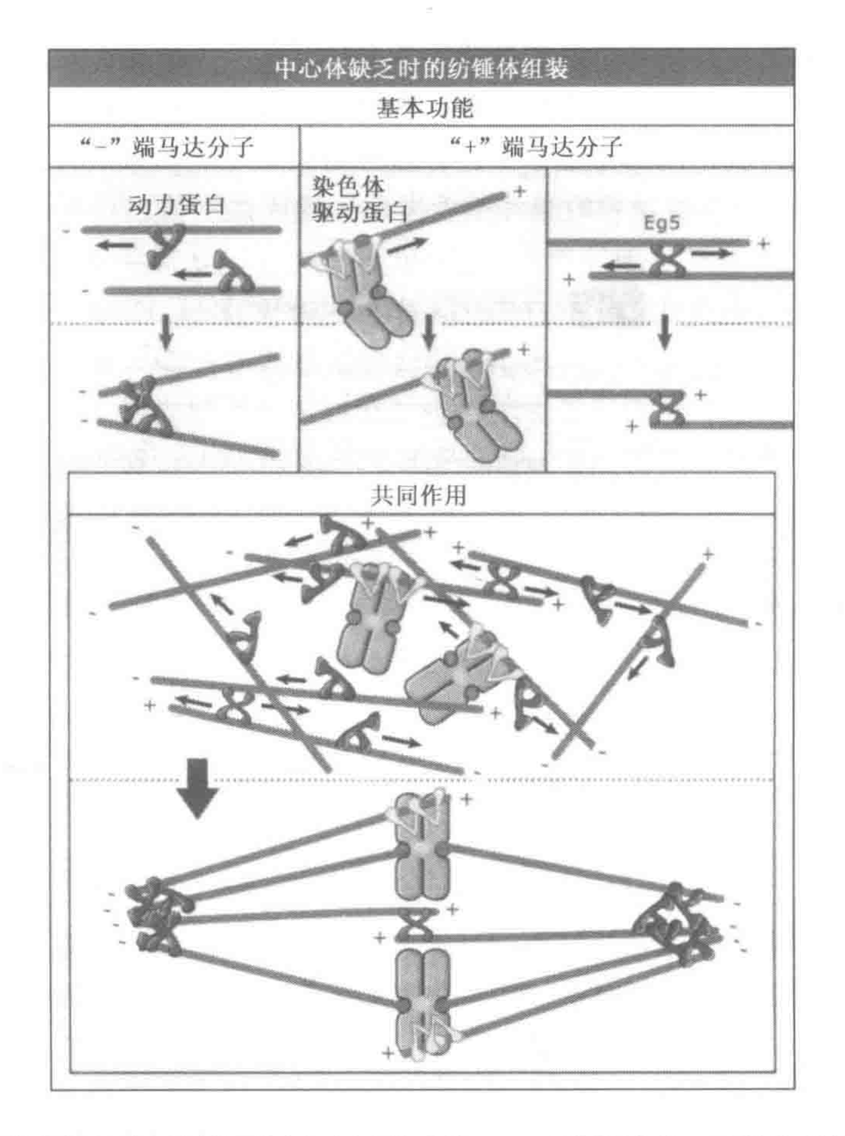


图 10.12　微管在染色体周围以不同方向随机成核。一旦微管形成，三种类型的马达分子便共同起作用，将它们组织到染色体周围的双极结构阵列中。

确定了胞质分裂时分裂沟的位置。这是星体对于正常发育的一种很关键的功能。最后，除了作为微管组织中心外，中心体还在细胞中发挥其他作用［例如在**初级纤毛（primary cilia）**形成和细胞周期进程中］。将中心体与每一个纺锤体极结合起来，对于每一个新细胞都继承一个拷贝的这种重要细胞器来说是一种便捷和可靠的机制。

10.9　着丝粒是染色体上的包含动粒的特殊区域

关键概念

- 对于染色体的精确分离来说，它们与纺锤体的正确附着是必需的。
- 这样的附着发生在动粒上，在这里染色体与纺锤体的微管相互作用。
- 着丝粒（centromere）是染色体上位于两侧的动粒形成的部位。
- 每一条染色体具有单一的着丝粒区域。
- 着丝粒处缺乏基因，包含了高独特化的、与一组独特的蛋白质结合的重复 DNA 序列。

有丝分裂的关键事件之一是染色体正确地与纺锤体附着。不正确的附着导致染色体分离的错误，给机体带来潜在的灾难性后果。附着过程的许多可靠性保障来自动粒（每

条染色体上与微管互作的特殊的微小结构）的属性。

染色体与纺锤体微管的附着发生在着丝粒区域。这是每条染色体上为实现这个目的而高度特化的区域。在浓缩的染色体上，着丝粒是在光学显微镜下可以清楚地观察到的缢缩区域（见图 10.1）。着丝粒的缢缩赋予染色体特征性形状。在不同的染色体上，着丝粒可以位于近中央位置（中着丝粒的，metacentric）、近端部位置（acrocentric）或介于两者之间的其他位置（亚中着丝粒的，submetacentic）；在同一个染色体中，着丝粒的位置是不变的。

着丝粒区域在化学上与染色体的其余部分不同，它即使包含基因，数目也很少，并且包含几乎全部的称为 α-DNA 的大数量高度重复卫星 DNA 序列。一个独特的蛋白质群体与这些序列相结合，称为**着丝粒蛋白（centromere protein，CENP）**。CENP 包括 CENP-A（一种修饰了的 H3 组蛋白）、CENP-B 和 CENP-G（参与卫星 DNA 包装），以及 CENP-C（功能未知）。大多数 CENP 发挥着结构功能，结合到重复序列中并将它们组织到在染色体其他部位未发现的高度压缩的，称为异染色质（heterochromatin）的染色质中。

除了 CENP 外，着丝粒区域也包含一类其他蛋白质，称为**染色体过客蛋白（chromosomal passenger）**。由于过客蛋白在有丝分裂中变换位置，它们是不常见的。不像在整个有丝分裂过程中都保留在着丝粒中的 CENP 那样，过客蛋白只在前期和中期出现在着丝粒上，而在后期开始时再定位到两组处于分离过程中的染色体之间的纺锤体微管上。所有目前已经鉴定出来的过客蛋白看来都在着丝粒中形成一个单一的复合体，其中包括一种在失活状态下对纺锤体的组装产生影响的酶——aurora B 激酶。这种复合体对于有丝分裂早期动粒附着错误的矫正很重要。在定位于着丝粒时，复合体一定会发挥这种作用。此后很长一段时间，当复合体移动到纺锤体中板内的微管上以后，它随即又参与胞质分裂。

除了 CENP 和过客蛋白以外，中心体区域也包含一种驱动蛋白相关蛋白。不像沿着微管侧面移动的大多数驱动蛋白家族成员那样，这种蛋白促使微管的正极去组装（驱动蛋白的细节见图 7.12）。近来的证据表明，这种马达蛋白与它的 Aurora 激酶活化因子一起，参与动粒附着中错误的纠正。

可能着丝粒的最重要功能就是在染色体上组装动粒。动粒是高度确定的结构，而每个着丝粒的表面是特异化的，有利于其组装。对于整条染色体来说，它们是极端微小的，只有用电子显微镜观察，才能看清它们的形状和内部结构。每个着丝粒形成两个动粒，很精确地处于染色体的相对两侧。动粒是染色体准确附着于纺锤体的位置，而它们之间在每条染色体上相对于对方的精确定位，对于有丝分裂的成功起到了根本性的重要作用。

10.10 动粒在有丝分裂前中期起始点形成，包含微管马达蛋白

关键概念

- 有丝分裂伊始，动粒的结构发生改变，在着丝粒表面形成一个平坦的盘子或垫子样平面。
- 未与纺锤体附着的动粒具有自它们向外伸出的微管纤维（纤维冠，corona），其中含有许多与微管相互作用的蛋白质。
- 纤维冠所行使的作用是协助动粒捕捉微管。

每个着丝粒上结合的两个“姐妹”动粒是背靠背的排列关系，因而处于着丝粒的相对的两侧，面朝相反的方向。这种姐妹动粒背靠背的定位关系有利于保证每一个动粒只与一个极附着，而且两者附着到不同的极。只要一条染色体获得了这样的正常两极附着结果，它的两个姐妹动粒就只向纺锤体相反的极运动。动粒的这种结构和定位关系是复杂的，并且在细胞周期进程和有丝分裂的不同阶段发生变化。

直到20世纪80年代，动粒的组成还相当神秘。那时人们发现，一些称为CREST综合征（一种系统性硬皮病变异类型）的自身免疫疾病病人血清中含有针对动粒蛋白的抗体。用这些抗体进行间接免疫荧光检测，发现在间期细胞中，染色体已经复制了的细胞核内成对毗邻的荧光斑点信号，其数目与核中染色体的数目相等。这些抗体识别间期细胞中的、将要成熟为有丝分裂动粒的前体结构。这些**“前动粒”（prekinetochore）**包含若干种CENP，在电子显微镜下呈球状，是紧密包装着嵌入着丝粒异染色质的纤维状物质的结构。当细胞进入有丝分裂、染色体开始浓缩时，更多的成分结合到前动粒之中。

当核膜崩解时，还有更多的成分加入到前动粒之中，前动粒也相应地发生物理学变化；前动粒的球状纤维团特性被非常薄（50～70nm厚）的圆形或有时是矩形的纤维盘状或席状结构所取代，处于着丝粒的表面。这种新动粒形式的直径尽管变化很大，但通常大约是0.2～0.5μm，即使在同一细胞中的不同染色体上（作为对比，一根微管的直径大约为0.025μm，而一条有丝分裂染色体从头到尾的长度可以达到大约40μm）。对于动粒盘的装配，有若干种蛋白质很重要，其中包括CENP-A和CENP-C。这些蛋白质被发现处于着丝粒上席状动粒结构所附着的表面上。

当动粒没有与微管附着时，自动粒席状结构表面延伸出细纤维组成的致密网络结构。这种网络就是集结成帽状物质结构的**纤维冠（corona）**。在纤维冠中，发现了几种对于动粒的功能很重要的蛋白质，包括胞质动力蛋白（一种微管负极端马达蛋白）、CENP-E（一种驱动蛋白家族成员、微管正极端马达蛋白）和另外几种对于微管在动粒上附着有利的蛋白质，其中至少包括一种＋TIP。此外，纤维冠中也含有几种监控纺锤体组装的细胞周期检验点成分。纤维冠中发现的大多数蛋白质与纤维冠进行动力学结合，并不断地解离而后又重新结合。这种连续的周转使得动粒成为一个状态稳定的结构，它的总体形态和组成保持不变，但各个单独成分一直处在变化中。

纤维冠的一部分功能是协助动粒捕捉微管。有丝分裂早期纤维冠的存在大大地增加了纺锤体形成期间染色体必须附着的动粒的表面积。纤维冠中与微管结合的马达蛋白和其他蛋白质使得附着过程得以加速，因为它们在每个动粒周围产生了一个大表面，使其就像捕蝇纸捕捉苍蝇似地抓住并牢牢捕获微管。

当动粒获得微管并与纺锤体附着时，纤维冠中的许多成分开始消失并/或者重新分布。同时，动粒结合分子马达蛋白的数量也减少。然而，如果由药物通过去组装去掉了动粒上结合的微管，这些蛋白质还要重现。

动粒不同部分的组成和它们各自所起的作用见图10.13。在每个部分的不同蛋白质的数量集中体现了动粒结构有多么复杂。注意在整个动粒中贯穿着与微管相互作用的蛋白质。

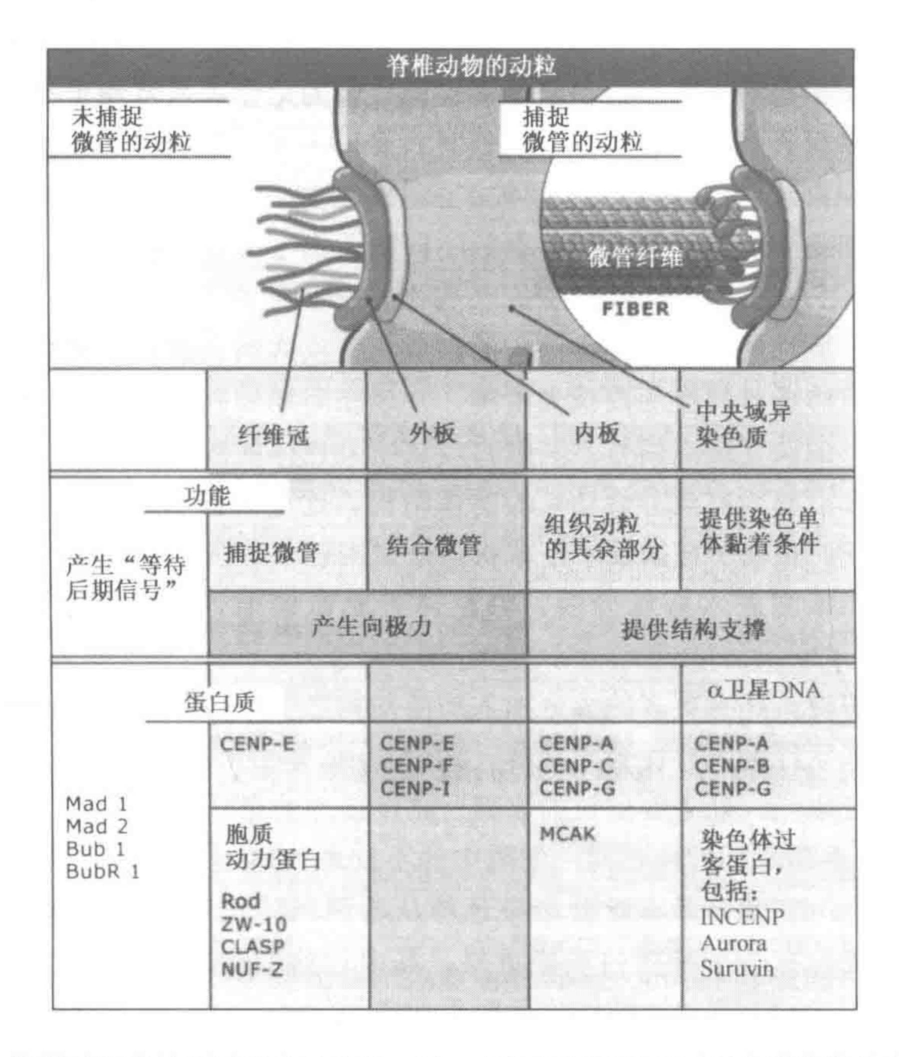


图 10.13 脊椎动物动粒不同部分的功能。每一部分中发现的不同蛋白质的数目表明了其结构的复杂性。

10.11 动粒捕捉和稳定了与其结合的微管

关键概念

- 动粒和微管以一种搜索-捕获（search-and-capture）机制相结合，而这种机制之所以成为可能，是因为微管的动力学不稳定性。搜索-捕获机制赋予纺锤体组装以高度的灵活性。
- 由于捕获了微管，动粒发生向极运动。这加速了更多微管的捕获并开始一根动粒纤维的组装。往往是一个姐妹动粒捕获微管并在另一个姐妹动粒之前发展出一根动粒纤维。
- 动粒对所结合分子的稳定能力是动粒纤维形成的必要条件。
- 张力下的动粒比没有张力作用的动粒能更有效地稳定微管。

染色体与纺锤体的附着，需要其每一个动粒结合来自两个中心体之一的微管。那么，星体微管和动粒之间实际上是怎样相互发现对方，从而发生附着的呢？这是细胞特别需要有效解决、实现保真性的特殊问题。染色体很大，扩散得非常缓慢，因此动粒无法通过自身移动去协助这个过程。所以，动粒是微管必须发现的稳定目标。细胞动粒的规模很小，而它们总数有 92 个（以人类细胞为例），在染色体都要正确分离的情况下它们全都要发现和结合微管。这样的问题是相当复杂的，因为有丝分裂伊始，动粒的定位是不可预测的。在核膜崩解以后，染色体在整个细胞质中分布，

其位置和取向在不同细胞中、不同的细胞分裂中各不相同。纺锤体必须正确地形成，不管染色体如何排列。除了要特别保真以外，很显然微管发现和附着动粒的机制还必须特别地灵活。

这些问题的解决靠纺锤体的动态行为来实现。在有丝分裂开始前不久，两个中心体成为修饰状态，因而比在间期时能够发挥更大的成核作用，组织更多的微管。大体在同一时间，微管的动力学特性变得更加突出；细胞内的突发事件更加频繁起来，收缩的微管很少再被修复，而是常常被彻底解聚。这两种变化产生一种情形，其中大量的微管自两个中心体的每一个从随机的方向不断地聚合，而如果没有被稳定，则完全地解聚、消失，丢失的微管被在其他方向生长的微管所替代。在纺锤体组装开始之前不久微管的动态的、具搜索性质的行为可以通过录像观察。图 10.14 是录像的第一个截屏。这一动态过程的结果是，在核膜崩解之后，整个细胞内部被生长着的微管的端头连续地探测。在这种条件下，每一个动粒与星体微管的相遇只是一个时间问题。这种**搜索加捕捉机制（search-and-capture mechamism）**保证了所有动粒与微管得以附着，因而使得纺锤体得以组装，不管在有丝分裂一开始时染色体以什么样的取向处于什么位置。

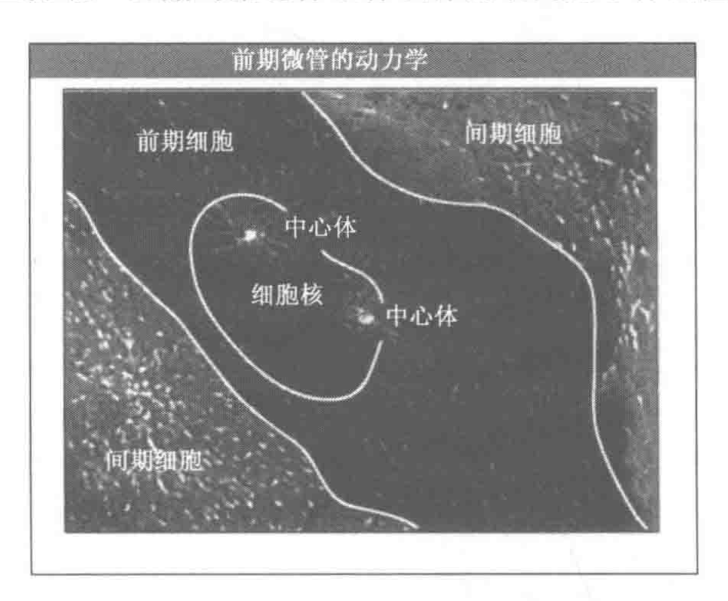


图 10.14　录像片的第一张截屏：获得鸟类细胞表达一种蛋白质 EB1（荧光显示），结合于生长中的微管顶端。细胞核显示为一个略为黑暗的区域，处于两个中心体之间稍微偏左一些。照片由 Massachusetts 大学（Amherst）的 Petricia Wadsworth 惠赠。

当一根微管遇到一个动粒时，它就被结合于动粒纤维冠中的分子马达所束缚住。在某些情况下，动粒附着在微管壁上，而在另一些情况下，它直接附着在微管的正极端。在这两种情况下，动粒立即沿微管开始迅速地向极运动，见图 10.15。这种运动的结果是染色体被拖向纺锤体的极部，而起引领作用的是动粒。在这一过程中的某些时刻，起初附着于一根微管侧面的动粒向其他星体微管的正极端附着。随着附着于纺锤体，动粒的向极运动也确定了它的朝向，因而它此时是面向极部的。由于已经确定朝向的动粒继续向极运动，它捕捉到更多的微管，开始了动粒纤维的形成。因为在新微管被捕捉时动粒是面向极部的，它们中大多数以其顶端结合在动粒板上并终止于此。有丝分裂早期动粒微管的逐渐形成如图 10.16 所示。

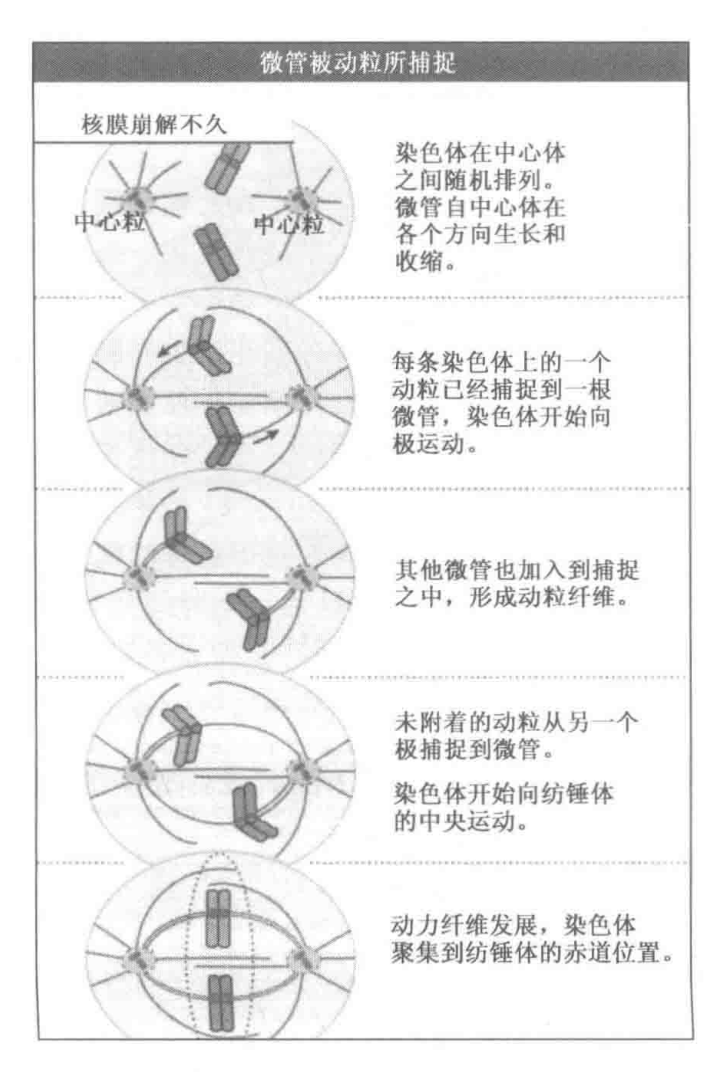


图 10.15　动态的微管通过自中心体开始的随机取向的生长和收缩，在整个细胞中搜索动粒。遇到动粒的微管被捕捉和稳定住。这种纺锤体组装的搜索加捕捉机制（search-and-capture mechamism）使得无论起初细胞是什么形状、染色体处何位置，纺锤体都能形成。

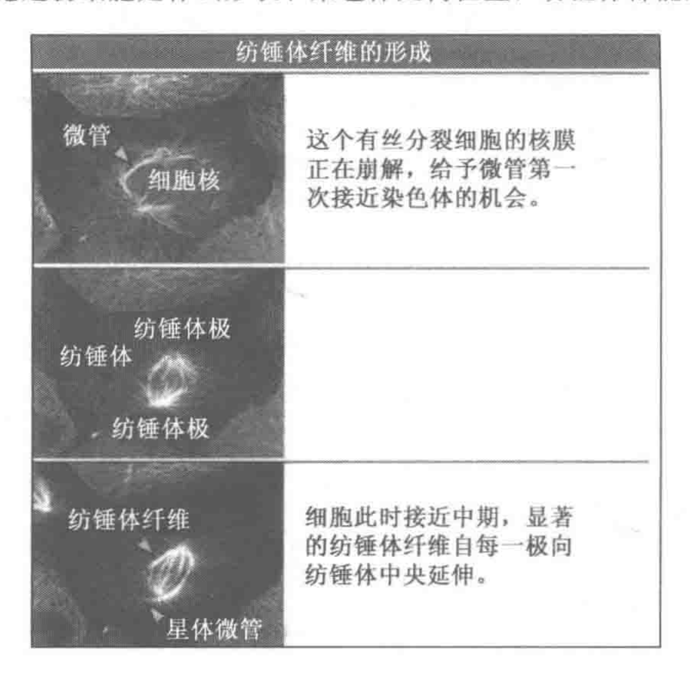


图 10.16　截取自一个录像片的图片，显示微管向染色体的附着、形成纺锤体微管的方式。照片由 Massachusetts 大学（Amherst）的 Petricia Wadsworth 惠赠。

由于搜索加捕捉机制的随机性质，姐妹动粒很少同时附着于形成中的纺锤体上。在第一个动粒处于附着状态后，染色体被认为成为**单一取向**的（见图 10.15），另一个动粒处于非附着状态，直到它捕捉到一根自远处一极生长的微管。一旦这捕捉得以实现，染色体就成为**双取向**的了，将染色体与纺锤体极连接起来的一根动粒微管得以发展（见图 10.15）。双取向性是确保后期过程中复制了的染色体的两条染色单体将进行相反的向极分布的唯一取向方式。一旦一条染色体成为双取向的，它就开始朝着纺锤体的中部运动。当它这样行动时，两个动粒的功能是不同的：一个必须向着它附着时面向的一极运动，需要动粒纤维的缩短；而另一个必须在一根延长的纤维上远离其所面向的一极运动。因为双取向对于染色体的忠实性分布是必不可少的，细胞已经进化了一种**细胞周期检验点（checkpoint）**，用来监控姐妹动粒的正确附着（这在下面会讨论到）。

动粒改变了它们所连接的微管的特性，而它们的影响对于最初与一根单一微管相附着的一条染色体转变为完整纺锤体中的连接状态是必不可少的。一根微管与一个动粒之间相互作用的最重要影响是使前者获得很长的寿命。与一个动粒相结合的微管具有大约5min 的半寿期，而纺锤体中剩余的那些微管一般只能保留不到 1min 时间。增加了的稳定性导致微管在动粒处积累，促使动粒纤维形成。然而，即使是动粒纤维，其微管也是动态的，单个微管也会偶尔与动粒脱离而丢失，然后新的微管又掺入。

最终结合在动粒上的微管数量受到动粒大小和动粒上的微管附着周转率的影响。动粒越大，能够与其及时结合的微管数目就越多。高等动物的动粒一般具有结合 20～40 根微管的容量，但是实际上的动粒纤维可能要少一些，因为不断发生着微管的脱离和重新结合。

那么，是什么决定了微管从动粒上脱离下来的速率呢？有很好的证据表明，这部分地取决于动粒和它结合的着丝粒之间的紧张程度。例如，在纺锤体形成过程中，如果用一个细针头去牵拉双取向染色体，使之远离相应的纺锤体极部，则指向这个极的动粒微管就会增加。显而易见，张力在某种程度提高了动粒处微管的稳定性（因而也使其在这里积累）。关于这一点，一种重要的迹象是它提供了选择性地稳定染色体在纺锤体上正确附着的条件：当姐妹动粒附着于并被牵拉向相反的一极（也就是它们适应成功的有丝分裂而正确取向）时，它们将处于最大的紧张状态，它们的动粒微管也相应地最稳定。

10.12　动粒附着的差错有矫正机制

关键概念

- 作为过渡性情况，染色体在纺锤体上时常发生不正确的附着。
- 不正确的附着是不稳定的，因为它们不能使动粒将附着的微管稳定住。
- 只有染色体的正确的、双极性的附着才能产生稳定的动粒附着结果。

对于纺锤体形成过程中附着错误的矫正来说，微管-动力连接对张力的敏感性很重要。搜索加捕捉机制可能产生两种不正常的附着结果，而且都发生于正常的有丝分裂过程中。当其两个动粒都附着于同一极时，一条染色体就被称为同端（syntelically，希腊文中 *syn*＝相同，*telo*＝端头）附着的，见图 10.17。这种情况通常发生在核膜刚刚崩解之后，此时染色体的朝向随机并可能更靠近一个中心体而相对远离另一个，使得姐妹动粒同时捕捉到发源于同一星体的微管。

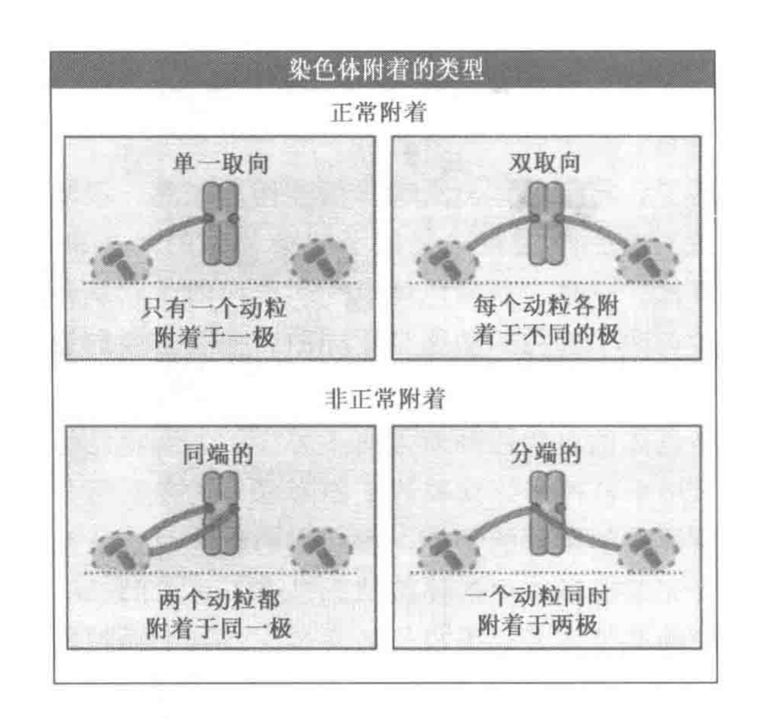


图 10.17 双取向是保证染色体能够等同地分配到两个子细胞中的唯一附着方式。在后期开始之前，所有染色体必须都是双取向的；在形成双取向状态的过程中，单一取向是正常的中间状态。同端的（syntelic）和分端的（merotelic）附着经常发生于前中期的早期，而在中期之前正确地形成双取向的状态。

单一的动粒也可能同时与两个极附着［分端的（merotelic）附着，希腊文中*mero*＝分别］（见图 10.17）。包含一个（或者甚至两个）分端附着取向动粒的染色体正常地向纺锤体赤道运动，并给细胞带来一系列严重的问题。如果分端附着状态持续下去，两条染色单体将在细胞进入后期时分开，但是被不正确附着的染色单体滞留在近纺锤体赤道板的地方。这条染色单体将滞留在那里，直到它与一个极部的附着断裂，这引起这条染色单体有 50%的可能性与它的姐妹染色体分离到同一个极。

不管是同端还是分端附着，都将在它们产生之后很快地被矫正。在这两种不正常的附着中，动粒纤维微管从一个锐角方向与动粒附着，而不是以钝角的方向。这样的结合扭曲了动粒，使得动粒和动粒纤维内的微管之间的连接变得不稳定。结果，微管很快脱离，而且也很难被正确附着的微管取代。在这种情景下，一个动粒的纤维中微管的数量迟早将减少到零，一个附着点将断裂。根据所涉及不正确附着的类型，一个附着点的断裂或者以双取向染色体的产生而使问题得以弥补，或者造成一条染色体只通过其一个动粒仅附着于一极。这种单取向染色体此后还可能通过常规的机制转变为双取向的。

动粒对张力的敏感性也在矫正不正常的附着中承担着重要角色。不正确的附着使染色体的两个动粒不能面向两极，从而丧失正常附着后所产生的张力。特殊的同方向附着（两个动粒连接到同一极）是不稳定的，因为施加在两个动粒上的张力几乎没有，远远小于当染色体被正确定向并且它的两个动粒被牵拉向两极的时候。此类错误常常被因缺乏拉力而致的其中一个附着的丧失所纠正，这在细胞中是自然发生的。另外，当其中一个动粒获得额外的来自较远的另一极的纺锤丝附着后（图 10.18），这个问题也可以被解决。这种额外的附着导致动粒突然遭到一个反向的拉力，使结构遭到扭曲并且使原来的附着不稳定起来。

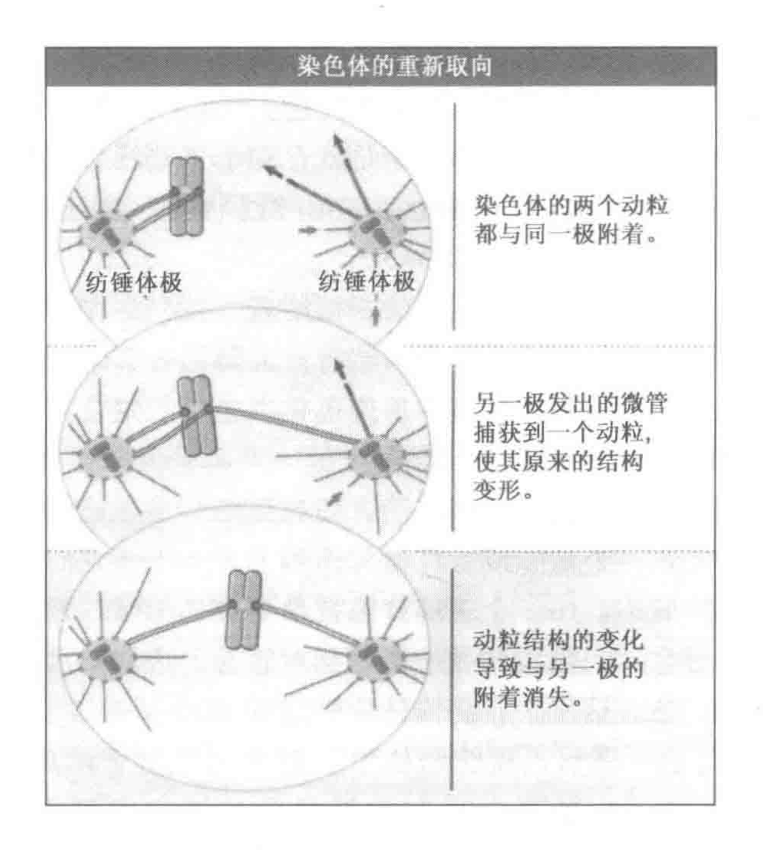


图 10.18 没有被正确附着的染色体重新取向的能力，依赖于有丝分裂过程中微管的动态变化以及动粒对结构扭曲的敏感性。只有当最下面的图中所示的结构完成时，动粒纤维才能发展，染色体被稳定地结合到纺锤体中。

附着过程的扑朔迷离表明了动粒的复杂性以及它们在有丝分裂中发挥的核心作用。实际上，已复制的染色体能均等地分成两组是动粒相关的行为和功能直接导致的结果。1961 年，研究有丝分裂机制的先驱者之一 Mazia 强调了有丝分裂机制的重要性，对阐述有丝分裂而言，动粒是染色体必不可少的一部分。他把染色体的剩余部分比作“葬礼中的尸体”，尽管它是整个行为发生的原因，但却不是积极参与的部分。虽然 Mazia 认为有丝分裂的真正目的是分离姐妹动粒（染色体的剩余部分随着分离）的观点是对的，但是在当时他还想不到这样的大分子聚集体参与并指导了这个过程。

总之，动粒纤维使染色体附着到纺锤体并且决定了染色体将要移动的方向。有丝分裂过程中染色体的平均分离与以下几个因素直接相关：①每个复制后的染色体具有两个姐妹动粒；②这两个动粒位于染色体主缢痕两侧，并且面向不同的方向；③动粒纤维微管和远离染色体的动粒的外表面结合；④细胞分裂中存在着纠正动粒和两极间不正确附着的机制，否则会导致非整倍体的发生。

10.13 动粒纤维必须能伸能缩以满足染色体运动的需要

关键概念

- 在有丝分裂各阶段中，作用在动粒上的指向两极的拉力一直存在。
- 动粒纤维锚定在两极附近。
- 这种锚定可能依赖于纺锤体基质，基质包含 NuMA 蛋白以及许多分子马达。
- 动粒纤维的长短变化是通过在其末端增加或减少微管亚单位实现的。
- 当微管长短变化时，两个动粒仍始终和两极相连。

自从有丝分裂过程被发现后，一直存在一个问题——“染色体是怎样移动的?”1880 年，Flemming 在他的陈述中总结了这个问题：“我们不知道对于细胞核中线状有形实体的运动或者位置变化，最直接的原因是就存在于这些线状物本身，还是在它们之外，或者两种情况都有。”（这里，Flemming 用“线状物”表述浓缩的染色体，而用“细胞核中的实体”描述述有丝分裂纺锤体）。

现在我们知道一旦一个动粒与纺锤体的一极附着，就存在作用在动粒上的指向纺锤体极方向的牵引力。我们也知道这种牵引力在有丝分裂的各个阶段都有，并且产生这种牵引力的机制也是一样的。所以，在前中期染色体发生中板集合时所受牵引力的产生机制和后期染色体被拉向两极的机制是一样的。

为了使施加在动粒上能驱使染色体移动，动粒纤维必须是锚定的。没有某种形式的固定，染色体就会停留在一个地方或者在微管作用下失去平衡，而不是随着微管向某一极移动。在显微操作实验中，用一个玻璃针拖拉单个染色体时，发现很难把一个染色体从一极中拖走，然而把它从一侧拨到另一侧则相对容易。这就暗示我们，动粒纤维微管是在负端被稳固地锚定的，这发生在纺锤体两极附近。

如图 10.19（见图版）所示，在纺锤体中，包含动粒微管的所有微管都被纺锤体基质围绕着。纺锤体基质中的蛋白质对动粒微管的锚定起到重要的作用。NuMA 蛋白是纺锤体基质中的主要成分之一，对保持纺锤体的完整性具有重要作用。纺锤体基质中 NuMA 蛋白的含量和微管的密度相关。如图 10.19 所示，从两极到纺锤体赤道板，微管的密度逐渐降低。纺锤体基质中也包含微管依赖性马达蛋白 Eg5 和 HSET，它们两者都属于**驱动蛋白（kinesin）**相关蛋白。HSET 是一种不寻常的

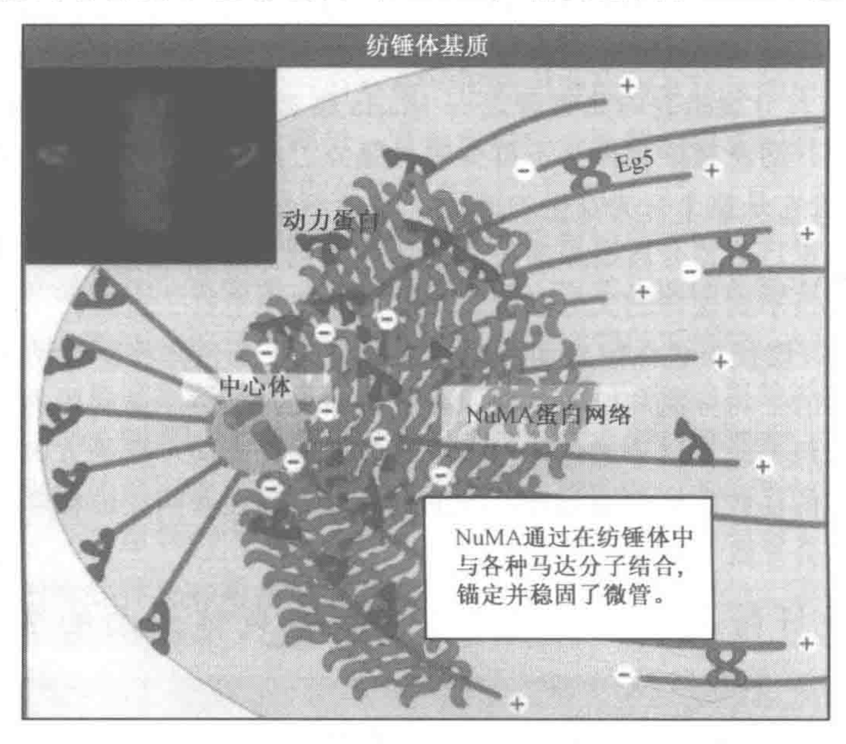


图 10.19 在纺锤体内部，NuMA 蛋白形成一个大量分支的交织状网络结构（基质），围绕着微管并且帮助组织微管和使微管锚定在纺锤体两极。和基质有关的马达分子可能和发生在两极的微管的动态变化相关，包括把动粒拉向一极。这张图显示的是一个中期细胞的免疫荧光的照片，红色标记 NuMA，蓝色标记染色体。照片由 Dartmouth 医学院的 Duane Compton 惠赠。

蛋白，它和胞质动力蛋白（cytoplasmic dynien）一样，沿着纺锤体微管向负极移动。结果，HSET 在纺锤体两极积累。目前，有关动粒纤维微管是如何锚定的模型认为，这些马达蛋白结合着 NuMA，而 NuMA 围绕在微管的负端。马达蛋白在结合 NuMA 的同时，也结合了微管壁，它们拖拉住微管，从而抑制了它们的运动并作为一种有效的固定点。

当动粒离开纺锤体一极时，它的纤维必须延长；相似的，当一个动粒向纺锤体一极移动时，它的纤维则必须缩短，如图 10.20 所示。动粒纤维的延长是在动粒处发生的，依靠添加微管亚单位来实现；动粒纤维的缩短既在动粒处也在纺锤体的两极发生，依靠微管的解聚来实现。在这两种情况下，为了始终保持和微管纤维连接，当微管在失去或添加亚单位时，动粒必须设法捕获微管的末端。同样，在纺锤体另一极纤维的极性附着也必然是复杂的，因而能允许微管缩短时有可见的亚单位脱落。目前这些发生在微管末端的显著行为的机制还不清楚，纺锤体微管和两端的附着可能和马达蛋白的关系很密切。在动粒处的附着被认为除了微管正端结合蛋白和着丝粒中促进微管正端缩短的蛋白以外，还有驱动蛋白类分子 CENP-E——一种马达分子的参与。

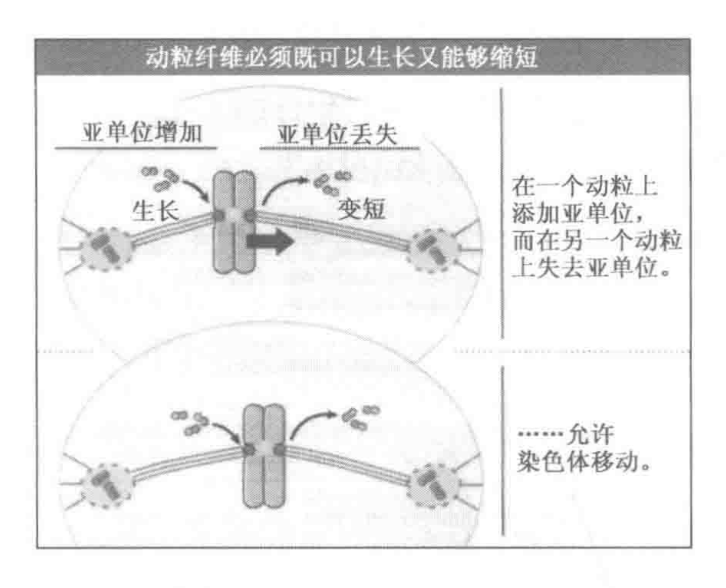


图 10.20 纺锤体内双取向染色体的运动需要其两个动粒纤维同时同等地进行生长和缩短。纤维通过在动粒处获得和失去微管蛋白亚单位以改变长度。

10.14 驱动染色体向两极运动的力量产生于两种机制

关键概念

- 一个动粒推动染色体向极运动，但运动的速度至多是动粒纤维上微管蛋白缩短的速度。
- 动粒上的动力蛋白通过在末端进行微管蛋白的解聚而推动染色体极向运动。
- 在动粒纤维侧面产生的力也可以推动整个纤维极向运动，并在之后推动染色体。

一旦一个动粒纤维充分形成，动粒就推动与它连接的染色体以 1～2μm/min 的速度向极运动。以这个速度，行进 20μm（或者说是大概纺锤体长度的一半）需要花费 10～20min 的时间。在理论上，以这种速度移动像一个大染色体这样大小的物体运动 20μm

所需要的力只有 10^{-8}dyn①。令人惊奇的是，产生这个力所必须的能量可以通过只水解 20 个 ATP 分子获得！

然而，在有丝分裂中真正发生的情况是非常不同的。用于移动染色体的力可以通过弯曲地置于其路径上的一个玻璃针确定距离来测量。这类试验产生了一个令人惊奇的结果：一个染色体上纺锤体可以施加的最大向极力是理论上在以有丝分裂中典型速度运动时所需力的 10 000 倍。所以，向极运动的速率并不是由施加在动粒上的力的大小决定的，更可能是通过一些其他影响因素决定的，这些影响因素不管施加的力如何都可以保持速率的稳定。以此类推，不管一辆车的引擎可以产生多大马力的力，齿轮齿数比仍决定了这辆车可以走多快；大部分车在第一次换档时都不能超过 60mi/h② 的速度。就纺锤体而言，限制因素是动粒纤维上微管蛋白的解聚速度：一个动粒只能以微管蛋白缩短的速度进行极向运动。

染色体的极向运动是通过两种机制进行的。这两种机制在整个有丝分裂过程中均有所体现，并且经常同时作用，如图 10.21 所示。一个机制需要动粒参与，另一个与动粒所结合的纤维有关。这两种机制在整个过程中所占份额的多少是不同的，由细胞的类型决定。在脊椎动物细胞中，定位于动粒上的微管蛋白依赖型于马达蛋白的活性、动粒纤维作为整体的向极运动这两个因素都决定并导致了运动的发生。

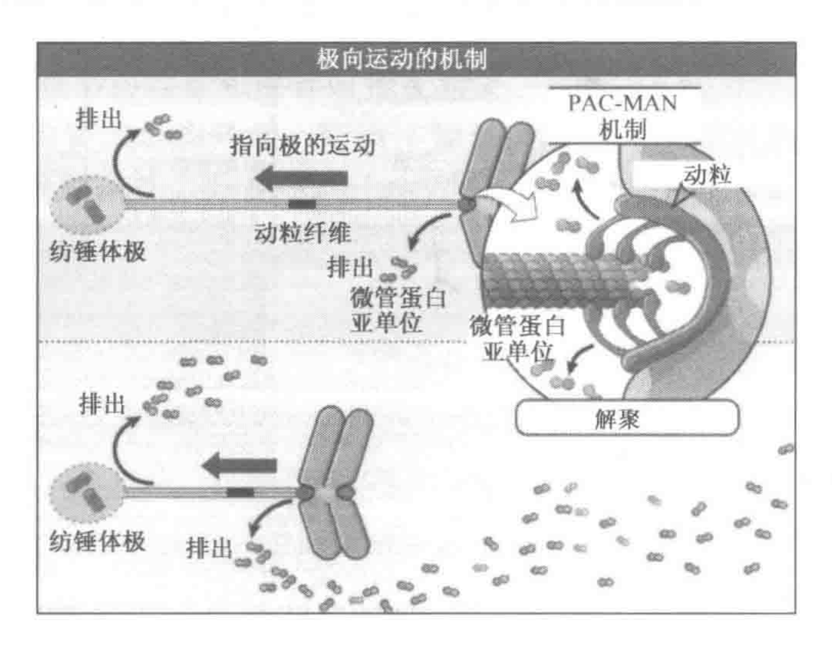


图 10.21 动粒处的马达沿着动粒纤维的微管蛋白极向运动。当动粒运动时，微管蛋白在马达蛋白后解聚。同时，其他力使整个动粒纤维向极运动，在此处亚单位也从微管上解聚。如在动粒蛋白上做标记（以黑色表示），标记处与动粒之间的距离和标记处与极之间的距离会随着染色体的移动而缩短。

在 Pac-man 机制中，动粒上的马达蛋白产生了作用力，在微管蛋白解聚下推动动粒纤维末端的动粒向极运动。所以，在动粒运动时，它可以被看作是在“咀嚼”纤维的末端，这就是这个过程的名称由来。在另一种叫做**“牵引纤维”（traction fiber）**的机

① 1dyn＝10^{-5}N

② 1mi＝1.609 344 km

制中，力沿动粒纤维而产生。在这个机制中，整个动粒纤维向极滑动，并拉着在其后的动粒。

染色体运动的Pac-man机制是由细胞质动力蛋白驱动的，这个蛋白是一种负端指向性微管马达蛋白。定位在动粒上的动力蛋白在其联系的微管的正极解聚时活跃地拉动动粒向极运动。在这个过程中，微管向动粒的压缩和（或）在其结构内存在的灾变促进因子诱导了微管正极端的解聚。动力蛋白在最初的动粒和纺锤体联结中也起作用，此时动力蛋白以超过40μm/min的速率沿着一个微管的边向极运动。

牵引纤维机制是基于出现在动粒纤维一个末端到另一个末端的微管蛋白亚单位的运动（变迁）。微管蛋白亚单位在动粒处合并到每个微管，然后跟着它向极移动，在极处他们再被释放（见图10.5）。只要动粒处亚单位合并的速度和在极处丢失的速度相等，动粒纤维保持一个稳定的长度，动粒也不会移动。然而，如果动粒停止结合微管蛋白亚单位的同时在极处仍然有亚单位在被移走，此时动粒就会被向极拉去（见图10.21）。所以，这种变迁也提供了一部分的力用于移动动粒和相连的染色体向纺锤体的极运动。

10.15 染色体的中板集合涉及作用在动粒上的拉力

关键概念

- 几种力的平衡使染色体在中期进行排列。
- 动粒上的力和染色体臂上的力都参与了作用。
- 一个有一定道理的模型认为，与每个动粒纤维长度成比例的向极力将染色体定位在纺锤体的中央。
- 这一机制适用于一些类型细胞中染色体的排列。
- 在很多类细胞中，还必须有其他力参与，其中包括由动粒产生的力和其他可将染色体推离极区的力。

1945年，一位研究有丝分裂的先驱Ostergren为中板集合提出了一个很好的解释。他认为“一个染色体的平衡位置暗示了着丝粒（动粒）会通过一个随着丝粒与纺锤体极间距离的增加而增大的力被纺锤体极所吸引，也暗示了每个着丝粒只会被它所指向的极所吸引。”换言之，作用于每个动粒上的向极拉力的大小与它相连的动粒纤维的长度成正比。以此来看，一个染色体向纺锤体赤道板的移动是因为此处是与相对的动粒纤维有相当长度的地方，也即是染色体上净力为0的地方，如图10.22所示。

Ostergren的“牵引纤维”模型从动粒纤维微管蛋白亚单位的运动（变迁，flux）中得到了支持。这种变迁表明分子马达蛋白的存在，这类蛋白定位于围绕着微管蛋白的纺锤体基质上。这些马达蛋白能沿着整个微管对微管蛋白亚单位施加一个向极拉力。由此导致的微管向极运动就是我们观察到的变迁。如果这一机制确实存在，那么微管越长，作用于动粒上的向极拉力就越大，正如Ostergren所假设的。在这一模型中，动粒只是简单地拽住一个运动着的纤维的末端，然后就被拖向纺锤体极。

在一些细胞（比如植物细胞和昆虫精母细胞）中，微管亚单位变迁是染色体向极运动的唯一机制。在这些系统中，牵引纤维模型仍是染色体集合的最可能途径，然而在其他细胞中，对牵引纤维模型的若干预测并不能见到，而且这很可能只是真实现象的一部分。比如脊椎动物细胞中，染色体向极运动过程中的变迁对染色体速率的贡献只有

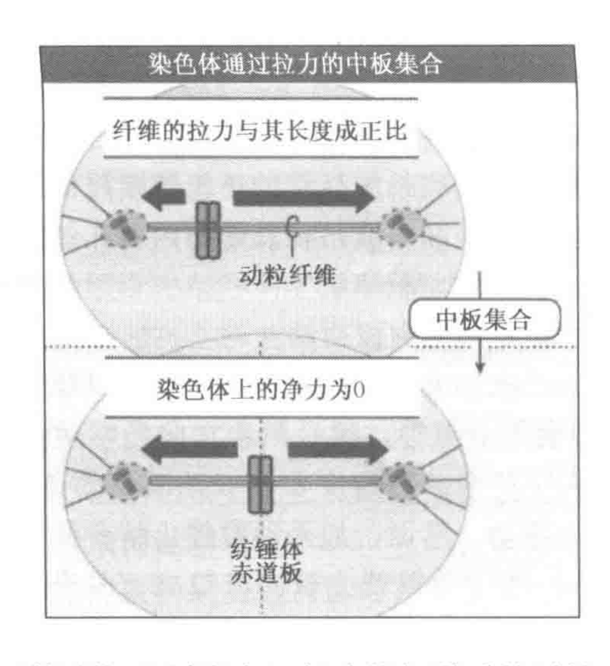


图 10.22 Ostergren 的聚集机理假说。一个双极指向的染色体从左边移向右边，是因为在每个姐妹动粒上的拉力与他们的动粒纤维成比例，长些的纤维产生更大的拉力。在这里，箭头的长度和方向指示了力的大小和方向。染色体会继续运动直到两个力平衡，这种平衡现象出现在纺锤体的中部。

30%，剩下的70%取决于与动粒相联系的活性。乍一看，这些发现好像会削弱 Ostergren 的观点成为脊椎动物中板集合模型的可能性。然而，当考虑到它所产生力的大小时，变迁的速率并未提供任何信息。所以，在脊椎动物中，很有可能变迁引起的向极力的贡献要远比动粒上马达蛋白所产生的强。

对于脊椎动物，这个模型还需要进行调整，因为人们已知，在脊椎动物细胞中作用于作用在染色体上的拉力不止只有动粒上所受的拉力。一个染色体只与一个极相连的现象支持了这一观点。染色体的定位是否只由其动粒的拉力决定，这在 Ostergren 的模型中已经预测，这种单指向染色体被认为会一直向极运动。相反，如图 10.23 所示，它们通常定位在很多微米以外的地方，表明了存在第二种力来推动染色体远离纺锤体极。

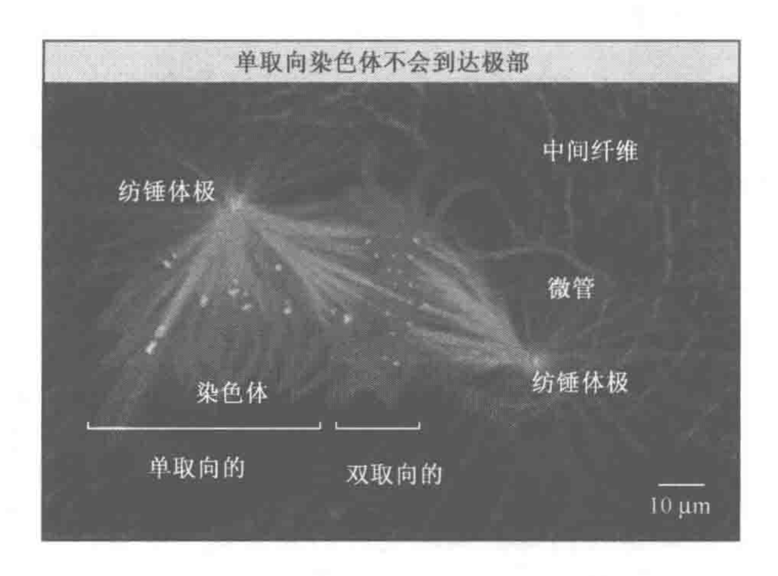


图 10.23 在这个前中期细胞中，大约有一半的染色体已经处于双取向状态并且在纺锤体的中部排列。剩下的（最少 7 条）仍是单取向的。尽管所有的单取向染色体非常清晰地只与左边一个极附着，但它们仍和它有一段距离。图中动粒表现为明亮的点。注意在双取向染色体上这一对点是无论如何都与纺锤体轴平行排列的，以及那些单取向的染色体是如何从极处呈放射性指向的。照片由 Wadsworth 中心的 Alexey Khodjakov 惠赠。

10.16 染色体的中板集合也受沿着染色体两臂的作用力和姐妹动粒活化的影响

关键概念

- 作用于染色体臂上的力推动他们远离纺锤体极。
- 这些力由染色体臂和纺锤体微管的相互作用产生。
- 动粒可以在有活性和无活性的状态间转换。
- 姐妹动粒在两种状态间的转换是同等的。

除作用在动粒上的力之外，有丝分裂中的染色体臂也承受着一个力的作用。这可以通过试验证明——使用一个聚焦非常精确的激光束从动粒上切断单取向染色体的臂，如图 10.24 所示；只要一脱离束缚，这个臂就会快速地从极区移开。这意味着在有丝分裂期间，染色体依旧承受着力的作用，将它们从各相应的极推开。这些被称为“极风”(polar wind) 的放射力很大程度上是由**染色体驱动蛋白（chromokinesin）**产生的。驱动蛋白家族的成员定位于染色体臂的表面，它们可以与纺锤体微管相互作用，并能促使染色体移向两极。另外有一种说法，认为这种精细的机制也归功于放射力。正在生长的微管，在其生长中有能力以其末端推动物体；在有丝分裂时期，从两极不断生长的微管可以协助染色体向外移动。由于微管的密度减少了，这两种机制都会产生一种力，可以随着远离两极的距离，在微管密度减小的同时逐渐减弱。在这种情况下，只和一极相连的染色体就会静止在一处，在这里“极风”的放射力和作用于动粒的向极力相平衡。这说明了这样的染色体不能行完向极运动的全程的原因，如图 10.25（见图版）所示。

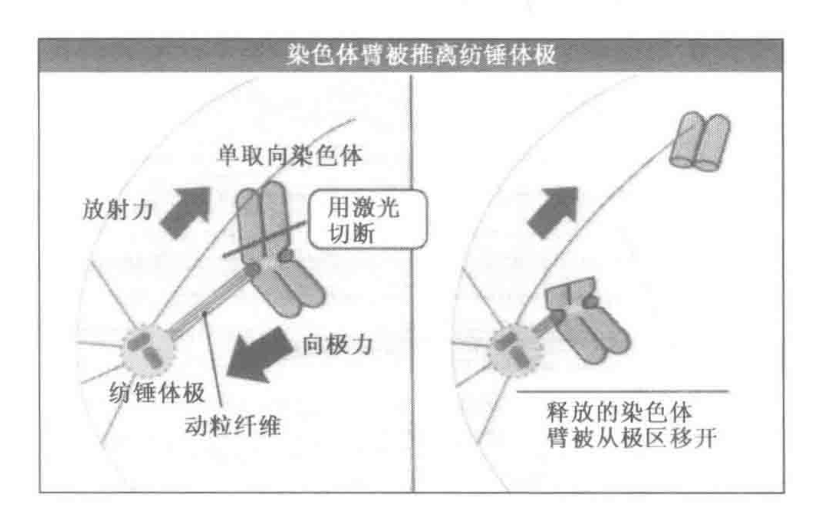


图 10.24 这个试验显示染色体臂经受了一个将它们推离极区的力。一个单取向染色体被稳定地定位在与它所连接的极部有一段距离的地方。如果染色体被切割，没有动粒的碎片被很快移动，离开极区，而剩下的部分向一个更接近极区的新的稳定位置移动。动粒处的向极力因此与作用在染色体臂上的放射力对立。

原有的牵引纤维模型也说明，动粒附着到纺锤体上之后就会经历连续的向极力。在这种情况下，一旦染色体附着到两极，它们就会被持续地移动到纺锤体中间，然后一直保持静止到后期开始之前。这一现象在多种细胞类型中都被证实了，包括那些来自植物和昆虫的细胞，他们的染色体在定位于中期细胞板之后不会移动。然而，在大多数细胞

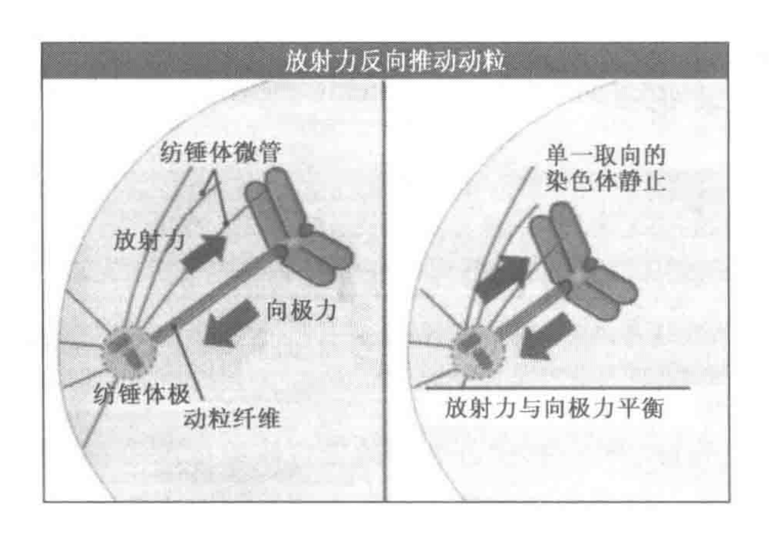


图 10.25　图中描述了作用在单一取向染色体的力。以动粒为基础的力（红箭头）将染色体朝向极点推动，同时放射力（绿箭头）推动染色体远离极点。当两个力达到平衡时（右图），染色体处于稳定状态。如果两个力中的一个比另一个力大，染色体就会移向或远离极点（左图）。

中，行进中的染色体会在纺锤体中间不断的来回移动。

上述运动由动粒引起，揭示出了它们作用中的重要内容。为了使振动能够发生，每个动粒必须存在两种不同的形式，并且二者之间可以相互转换。正如图 10.26 所示，姐妹动粒在两种形式之间的转换需要进行协调以便于染色体能向相反的方向移动。在振动过程中，由于染色体的移动，移向相关极点的动粒产生或经历一种向极力。在动粒移动时，定位于动粒纤维的微管蛋白亚基必然丢失。同时，其余的动粒则处于中性的状态，这种状态可以将动粒从两极拽到动粒纤维的末端，其中主动掺入的亚单位会促使动粒纤维延伸。当两个动粒交换角色时，染色体开始调转方向并开始新的振动。动粒引起的活动周期转变体现了动粒取向的不稳定性。姐妹动粒之间转变的调节方式可以对染色体在纺锤体上的定位产生很大的影响，但是，引起动粒在中性状态和活跃状态之间转变的原因还不是很清楚，或者说还不知道是什么因素协调了姐妹动粒之间的这种活性。然而我们知道，这样的转换必须对染色体相对于纺锤体赤道的位置敏感，否则染色体不可能很确定地保持在中央位置。

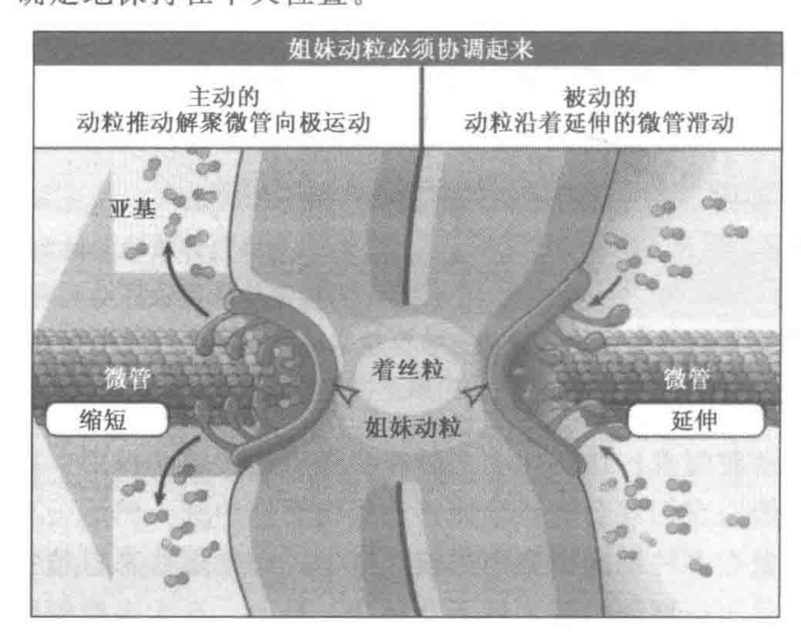


图 10.26　一旦附着到纺锤体上，动粒就会以两种状态之一存在。一种状态（左）允许动粒在缩短的动粒纤维上移向极点；另一种（右）则使动粒保持稳定，或者通过延伸的纤维远离极点。姐妹动粒的活性以未知的方式调节，从而使得两个动粒很少同时处于活性状态。

10.17 动粒控制了中后期转变

关键概念

- 检验点阻止末期开始，直到所有的动粒都连接到有丝分裂纺锤体上。
- 未附着的动粒会产生一种信号阻止后期的开始。
- 检验点对附着到动粒上的微管数量进行检测。
- 细胞中所有的动粒都附着后，后期促进复合体（APC）就被激活了。
- APC 的激活会导致促使将姐妹染色体连接起来的蛋白质的破坏。

后期开始时染色单体的分离提供了细胞经历中期到后期转化的可见证据。除了核膜的解体外，这就是细胞周期中最生动的证据了。与核膜的解体相对应，染色体分离也是不可逆转的。

如果在所有染色体连接到纺锤体的两极之前姐妹染色单体发生了分离，就会频繁地产生非整倍性。为了避免这种情形，演化出了细胞检验点，能监测到在有丝分裂期间动粒是否能连接到纺锤体上。没有附着或是附着不紧密的动粒标志了没有完全组装的纺锤体，会产生一种能够推迟后期开始的信号——“等待后期”信号，此信号一直能持续到问题得以矫正之前（见第 11 章细胞周期调控）。我们知道的原因是，在通常情况下，只要细胞包含一个单一取向染色体，后期就不会开始；但是如果微光束破坏了未附着染色体的动粒之后，后期就会马上开始（如图 10.27）。一旦核膜崩解，因为新的染色体动粒都是未附着的，后期开始的信号就会自动形成。因此，此信号会一直存在直到最后的

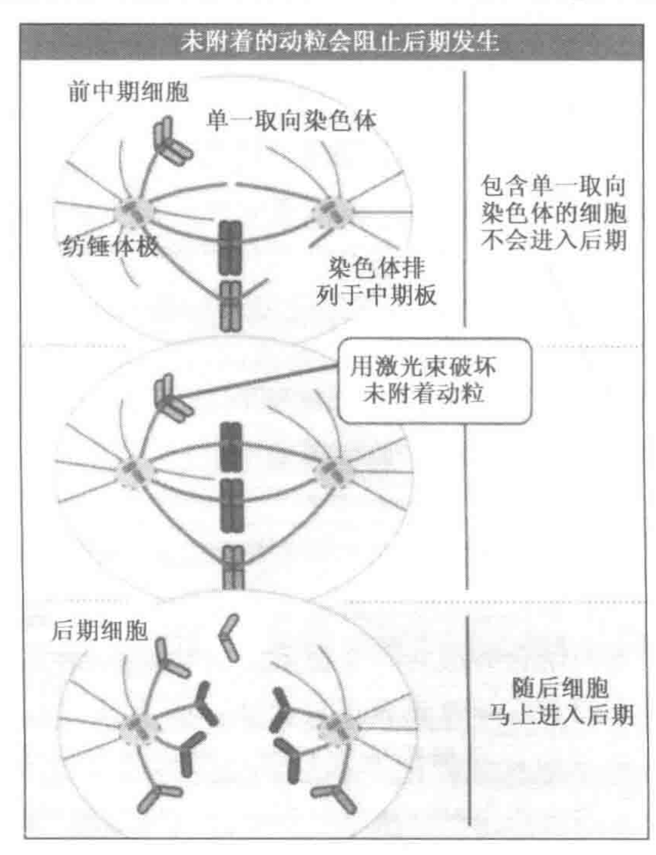


图 10.27　实验显示未附着的动粒会产生阻止后期开始的信号。图上方，细胞停止于前中期。用极细的激光束照射后，灭活了一个未附着动粒的组分，后期马上就发生。

动粒也附着到纺锤体上。

这一检验点被称作动粒附着检验点或者纺锤体组装检验点，在多数情况下它可以确保染色体能完全分离。然而，它并不能检测到什么时候一个动粒能同时结合到两极（**分端取向，merotelically oriented**）。由于检验点不检测这种错误的取向，这就意味着有些时候问题尚未解决后期就会开始。尽管在染色体分离时发生错误是少见的，但它们发生的比例仍可达到大约每 10 000 个细胞分裂发生一次的程度。目前的证据表明，分端附着是引起组织细胞发生非整倍化的首要原因。

纺锤体组装检验点可以监测出有多少微管可以连接到动粒上。当存在的微管太少时，动粒会产生等待后期的信号。当动粒所需要的微管增加到超过一个关键的阈值时，就会将这种信号关闭。因为动粒上的张力稳定了动粒结合的微管，促进了微管的积累，检验点对于动粒上张力的不足是敏感的。当姐妹动粒连接到相反的两极时，张力达到最大，检验点就能通过监测动粒上微管的数量，间接估计是否所有的染色体都正确地附着到纺锤体上了。

当纺锤体微管被药物破坏后，纺锤体组装检验点仍然能保持一段时期的活性。药物存在下信号的持续存在可作为筛选标准，用以分离缺乏检验点必需基因的酵母突变体。据报道这类基因编码 3 个 Mad（有丝分裂阻滞缺陷）蛋白和 3 个 Bub（苯并咪唑诱导的不受限制的出芽生殖）蛋白。这几种蛋白在脊椎动物（包括人类）细胞中拥有同源物。当任何一个 Mad 和 Bub 蛋白的活性受到抑制时，检验点就会被跨越过去，随即后期就会发生。在有丝分裂时期，此类蛋白中的某几个（包括 BubR1 和 Mad2）会不断地出现在未附着动粒上，而不在附着动粒上出现。

起始后期进而使染色单体分离的关键事件，是一个称为**后期促进复合体（anaphase-promoting complex）**的大分子集合体的激活。此复合体的工作是选择靶蛋白并将一个泛素分子链连接到蛋白上，对其进行降解。连接了这一标签的蛋白能够被识别并能通过蛋白水解机构（蛋白酶体，proteosome）被降解。后期促进复合体自身并不能够独立工作，而是需要一种辅因子来帮助确定和选择哪种蛋白要被降解，并且在什么时间降解。后期的起始需要 Cdc20 辅因子对后期促进复合体进行激活。纺锤体组装检验点通过抑制 Cdc20 的活性而起作用，而 Cdc20 受到抑制后又会阻止后期促进复合体对要降解的 securin 蛋白的靶向。Securin 的降解导致染色体上的胶黏蛋白（glue protein）降解，而后者是将复制的染色单体连在一起的因素。

确切地说，动粒和检验点途径中的组分是怎样影响 Cdc20 的，目前还不清楚。存在的问题是信号如何从动粒传到纺锤体上，而后期活性复合体正是在这里发现的。一种观点是，由 Mad2、BubR1 和 Cdc20 组成的复合体在动粒上形成，而随后又会被释放。另一种可能是，未附着动粒结合并激活一个或更多的检验点蛋白，然后释放活化了的蛋白进入纺锤体，在那里它们与 Cdc20 形成了复合体，阻止其对 APC 的激活。虽然还不清楚 Cdc20 与检验点通路蛋白在哪里形成复合体，但是已经很清楚地知道只要有一个具有活性的动粒没有与纺锤体相附着，这些复合体将会被持续形成（但是寿命很短）以抑制 APC 的活性，然而一旦最后的一个动粒被附着上，复合体对 APC 活性的抑制就迅速地被解除。由最后一个未被附着动粒发出的细胞后期等待信号是怎样被扩大以便影响整个纺锤体的呢？这个问题需要探索。

10.18 后期包括两个时相

关键概念

- 破坏姐妹染色单体之间的结合就能允许它们开始向极运动。
- 向极运动之所以发生是由于作用在姐妹动粒上的拉力不再相互对立。
- 在后期，有丝分裂纺锤体的延长增加了分离中染色体之间的距离。
- 作用在纺锤体中间带（midzone）微管上的向极推力和作用在星体微管上的拉力促进纺锤体的延长。

在最后一个动粒也附着到纺锤体上后，出现一个滞后期，然后才发生染色单体分离。在这个过程中，securin和其他蛋白被降解。一旦姐妹染色单体开始分离，该过程在细胞中就只需几分钟便可以完成。一般来说，姐妹染色单体的分离开始于着丝粒区域，因为它是染色体上向极力的作用支点。这个区域被分离后姐妹染色单体才被完全分开并且各自分别向极部移动。

把新分离的两套染色体向纺锤体极部移动的过程叫做有丝分裂后期A。这个过程和有丝分裂后期B是能够区分开的。有丝分裂后期B是指纺锤体极本身的分离过程。后期A和B如图10.28所示。这两个过程在后期中是同时进行的，但是它们对应着两个独立的机制，它们同时作用于染色体的分离。

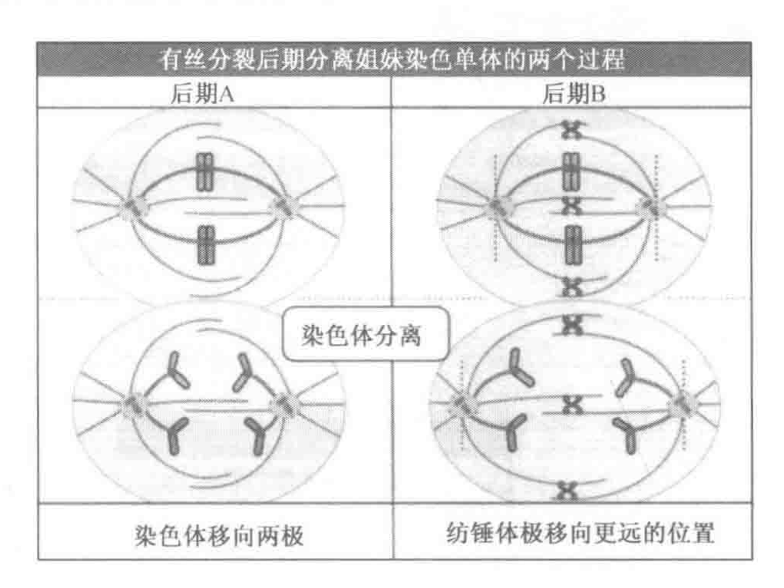


图10.28 当染色体移向两极时（后期A），纺锤体极本身也在向更远的方向移动（后期B），这可以进一步促进两组染色体的分离。星体微管产生的拉力和纺锤体中间带上的马达蛋白沿微管交替移动产生的拉力共同促进纺锤体极的移动。后期A和B可以使新形成的两个核离得非常远以保证细胞能够在它们之间更加有效地分裂。

虽然在有丝分离后期的起初阶段染色体就突然开始向极运动，但是分离它们的动力机制并不是启动于有丝分裂中后期转换阶段。这个观点在实验激光束破坏前中期（姐妹染色单体正常分离之前）双取向染色体的一个动粒中明显地得以证实。解除它与其中一个极体连接，但该染色体则可以完全像其他后期染色体一样迅速准确地移向另一极。因此在纺锤体形成和中板集合的过程中，驱动一个染色体向极运动的机制也在后期A中对染色体发挥着同样的作用。在有丝分裂的整个过程中，作用于动粒的向极驱动力是持

续存在的。在后期唯独不同的是作用于姐妹动粒上的力不再是相互对立而是可以独立发挥作用的。只要姐妹动粒已经分离，染色单体就开始向极运动。至于有丝分裂早期阶段中的向极运动，在脊椎动物中是由动粒和微管变迁活性来驱动的。

在后期 A 中，当两套分离的染色单体分别向极区运动时，两极本身也正在分开得越来越远，见图 10.29。这种纺锤体延长的过程就是后期 B。后期 B 增加了两组姐妹染色单体之间的距离，以便确保分裂沟准确地在两个新形成的细胞核之间产生。分裂沟能够分离细胞质形成两个新的子细胞。在一些组织中，后期 B 只在后期 A 之后开始。然而在脊椎动物细胞和绝大多数其他细胞中，只要姐妹染色单体分离，纺锤体两极之间的距离就开始增大，所以后期 A、B 过程是同时进行的。一般来说，纺锤体延长长度的能力是有很大变化的，甚至在相同培养物中相邻生长的同种细胞之间也如此。这种能力的不同可能与细胞的形状有关；在形态上长形细胞中纺锤体一般比小而圆形的细胞更长。

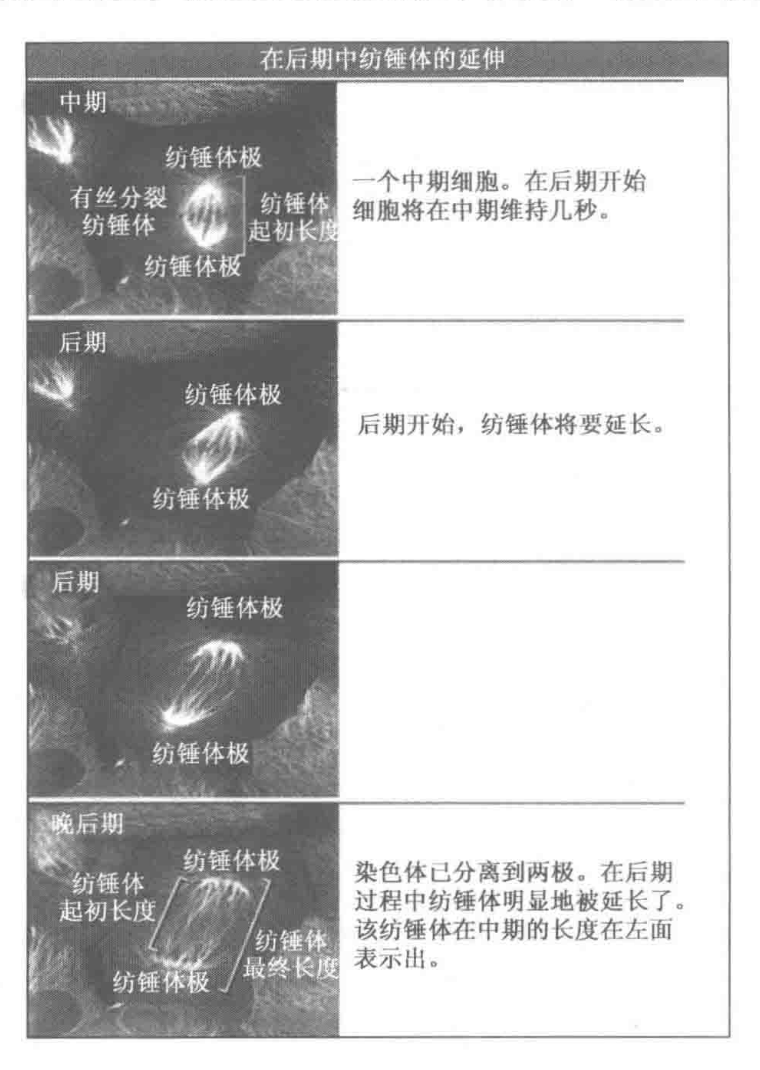


图 10.29　视频图展示在细胞后期中纺锤体长度的延伸过程。照片由 Massachusetts 大学（Amherst）的 Patricia Wadsworth 惠赠。

如图 10.30（见图版）所示，在后期 B 中有几个机制共同调控两极的分离过程。对于许多单细胞生物，如酵母、藻类和真菌，两极分离过程主要是由存在于两组分离染色体之间的纺锤体中间带产生的力来驱动的。在整个中间带中，产生于两极的微管相互重叠，而且驱动蛋白（kinesin）类蛋白质结合和交联着来自于两个极体的相邻微管。当

这些马达蛋白向微管的负端移动时，它们在相邻微管上的滑行推动着它们结合的微管向纺锤体极移动。这一过程也导致了纺锤体的延伸。在滑行的同时，交叠区微管的负端也在生长以保证交叠区域的大小不变。这些微管的生长决定了整个纺锤体可延伸的长度。

那些驱动后期 A 发挥作用的推动力在有丝分裂的早期阶段就已经存在。然而在后期之前，这些力与纺锤体中那些把两极向一起拉的力是对持的。这些对持力的一部分由微管负端的马达蛋白产生，这些蛋白也可以交联相反的极微管。这些对持力也部分地由双取向染色体上的姐妹动粒产生，并可以持续地把两极拉向赤道板。在后期的起始阶段，当姐妹染色单体最终分开时，这种力的平行被破坏，那些把两极向一起拉动的力变弱。结果是在两极之间的推动力发挥主要作用，最终把两极向两端推开。

在脊椎动物细胞中，这种“推动”机制在多大程度上推动纺锤体的延伸呢？这是个有争议的问题。这是因为在后期 B 极体分离时脊椎动物细胞的纺锤体上**非动粒微管（non-kinetochore microtubule）**负端已从极上脱离。因此，在后期中间阶段脊椎动物细胞纺锤体的向极运动并不是由推动力驱动，而是由牵拉力驱动的（见图 10.30）。这些牵拉力是由连接极体的星体微管和锚定在细胞外周部分（例如细胞皮质层）的胞质动力蛋白产生的。锚定在皮层的动力蛋白“卷”着星体微管，可以拉动两极分离。

图 10.30　当纺锤体在后期 B 延伸时，有两个机制推动纺锤体两极分开。在纺锤体中间带（橙色）中的驱动蛋白类双功能马达蛋白推动微管背向极部的移动。同时锚定在细胞特定皮质层区域的胞质动力蛋白（紫色）也拉动星体微管运动。

10.19　分裂末期发生的变化可导致细胞脱离有丝分裂状态

关键概念

- 启动细胞后期的细胞周期调控系统既启动胞质分裂也启动细胞回到间期的相关事件。
- 周期蛋白 B（cyclin B）的降解使 CDK1 失去活性，这个反应可以逆转一些变化过程，而这些变化过程发挥着驱动细胞进入有丝分裂期的作用。
- 当纺锤体组装检验点的条件得以满足时，cyclin B 就开始降解，但是在染色体分离之前将出现一个延迟，它拖延细胞进入末期的过程。

在染色体分离之后，细胞必须开始胞质分裂和最终退出分裂期。染色体分离之所以与这些事件非常协调，是因为有一个相同的**检验点（checkpoint）**控制细胞由中期向后期的转换。除了延迟染色单体的分离外，这个检验点也可以延迟生化信号通路的活化，这些活性信号可以引起胞质分裂和使细胞退出分裂期。这些通路一旦被激活，它们就无法“刹车”，结果是细胞一旦进入后期就必然要离开分裂期。

正像对于染色单体分离的作用一样，引起细胞退出分裂期的通路是被后期促进复合体控制的。一旦诱导细胞进入末期（有丝分裂的最后一个阶段）的通路被激活，在末期的每组染色体都将膨大和解压缩，而且在核周质区域将围绕染色体所在范围形成新的核

膜。同时纺锤体解聚，在星体处的微管延伸；在两组分离的染色体之间将形成一个新的以微管为基础的骨架，即**中体（midbody）**。在这些改变发生的同时，细胞表面也发生着很大的变化，这为胞质分裂做好了准备。

激活 CDK1 的 cyclin B 亚基的降解可以引发末期的启动。这里 CDK1 激酶是分裂期的催生因素。我们知道，当细胞中充满一种不能降解的 cyclin B 时，细胞的姐妹染色单体能够正常地分离，细胞能够完成后期 A 和 B。但是，纺锤体却不能解聚，中体不能产成，染色体将保持单个形态，细胞核不能重新形成，胞质分裂也不能发生。

驱动细胞进入分裂期的相关事件的逆向过程恰好可以促进细胞退出分裂期。正如先前讨论的那样，当 cyclin B 和 CDK1 激酶被激活后，细胞将被驱动进入分裂期。这个激酶可以磷酸化许多靶蛋白，从而改变靶蛋白的活性或定位关系。核膜和细胞内膜系统——如高尔基体和内质网——被裂解并形成小囊泡。中心体及其结合的微管阵列也发生很多改变，这些改变促进了纺锤体的形成。在细胞后期，cyclin B 调节亚基将被水解，进而激酶 CDK1 失去活性，许多被磷酸化以诱导这些变化的蛋白都变成非磷酸化形式。这一系列过程的发生，使产生有丝分裂状态的事件逐渐逆转。

在纺锤体组装检验点的条件得以满足后，cyclin B 便开始降解。然而，在后期 A 结束前，末期事件是不会发生的；只有后期 A 结束 10～15min 后，末期事件才能开始并完成。关于这一延迟的原因是非常清楚的：如果两组染色体没有分离到一定的距离，纺锤体就解聚、细胞核就形成了，细胞将面临一个潜在的灾难。在时间上的延迟将有利于一系列相关生化事件的准备，这些生化事件发生在 cyclin 降解之后，引起它诱导的细胞结构上的改变。

10.20 在胞质分裂过程中，细胞质分成两个部分使两个新的子细胞得以形成

关键概念

- 在胞质分裂的过程中有丝分裂形成的两个新的细胞核被分别分离到两个子细胞中。
- 胞质分裂涉及两个新的细胞骨架结构的形成，一个是中体，另一个是收缩环。
- 有丝分裂纺锤体、中体和收缩环彼此间是高度协调的。
- 胞质分裂主要包括 3 个阶段：分裂面的定位、分裂沟的形成和两个新细胞的分离。

在一个细胞中染色体发生分离后，它就必然要分裂。动物细胞的分裂是通过在新分离的两组染色体之间的位置发生缢缩来完成的。在接近后期 B 时，细胞表面开始在相应于胞内中期染色体聚集的位置发生缢缩。在 10～15min 后，一个细胞被分成两个，这一过程叫**胞质分裂（cytokinesis 或 cleavage）**。胞质分裂是细胞分裂的最后一个阶段。它发生在细胞即将走出有丝分裂状态的时期，要求 cyclin B/CDK1 激酶的失活。

像染色体分离一样，胞质分裂不仅要求有丝分裂纺锤体的存在，而且也涉及两个新结构［**中体（midbody）**和**收缩环（contractile ring）**］的形成，如图 10.31 所示。中体形成于有丝分裂的后期，它是由来自纺锤体的微管再组织形成的一个大的、平行排列的微管束。这一微管束在两组染色体之间扩展。随着许多独立的小微管束不断聚集，中体逐渐形成，如图 10.32 所示。收缩环是肌动蛋白纤维束在质膜下形成的一个紧密的带。像在肌肉中的肌球蛋白一样，双极性肌球蛋白纤维紧密连接着肌动蛋白纤维束。除了形

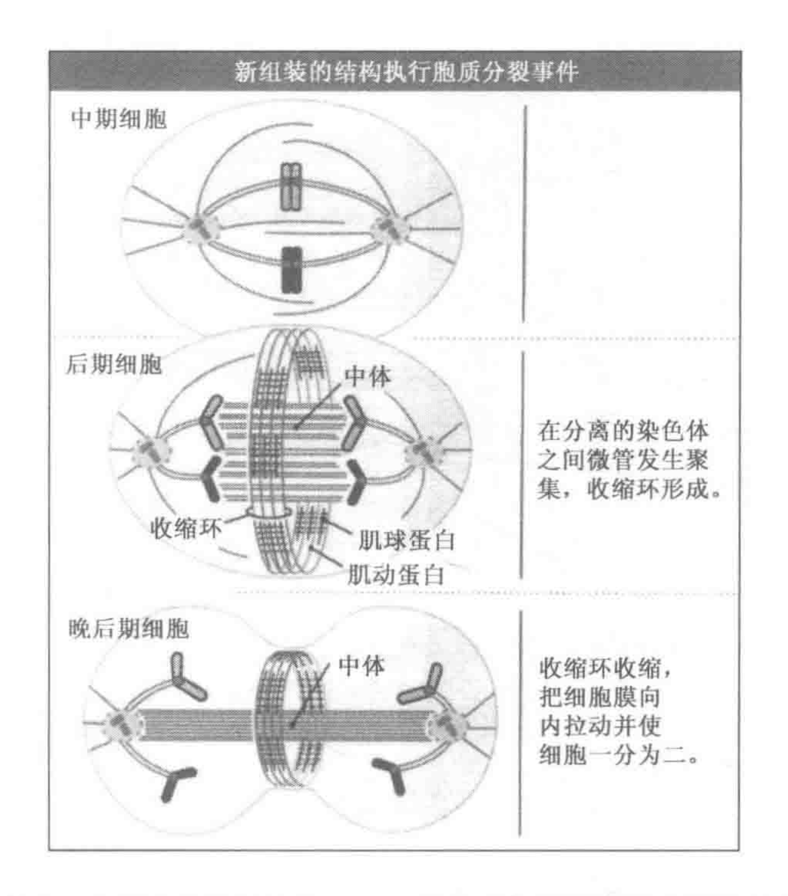


图 10.31　中体是一个很大的微管结构，有丝分裂后期微管束聚集于两组分离的染色体之间从而形成了中体。同时收缩环围绕在细胞质膜的下面而得以形成，它主要由肌动蛋白和肌球蛋白纤维组成。中体指导着收缩环形成的位置，收缩环将细胞一分为二。

成这些主要结构的蛋白质外，在中体和收缩环的形成中发挥作用的还包括很多其他蛋白质。

收缩环负责推动收缩进程并使细胞一分为二。正如它的名称，该环能够起到收缩作用，而这种收缩力来自环中肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用。因为收缩环与细胞质膜附着在一起，所以它的作用模式就像钱袋绳一样：收缩可以减小直径，逐渐减小正在分裂的细胞两半间开口的尺寸。因为在错误位置和时间的收缩将是一个灾难，所以在胞质分裂中收缩环的形成和功能依赖于与其他细胞骨架蛋白的相互作用。纺锤体的位置决定了中体形成的位置，中体形成的位置又限制了收缩环聚集的位置。这样的严格顺序可以确保收缩环只能形成于分离的染色体之间。染色体在收缩的时间进程上也起着重要的作用；当有丝分裂后期开始时，染色体能够在收缩过程的几个连续阶段给收缩环提供很多必要的因子，这些过程的失败都将阻止胞质分裂和导致双核细胞（binucleate cell）的形成。双核细胞存在于一些人类组织中（如肺、肝），但是它们很少再进行分裂。

像染色体分离一样，胞质分裂过程也可以再分为几个连续的阶段，每个阶段都受到一个或更多可识别的事件的限制。在这些事件中只有一步是不可逆的，它发生在整个过程的结束时刻。因此，在子细胞被分为两个完整的独立体以前，胞质分裂过程是完全可逆的。

在后期开始不久发生的胞质分裂第一阶段中，收缩环聚集在细胞皮层的位置就已确定，如图 10.33 所示。该位置也限定了细胞分裂平面的位置，随后收缩环聚集于这个位

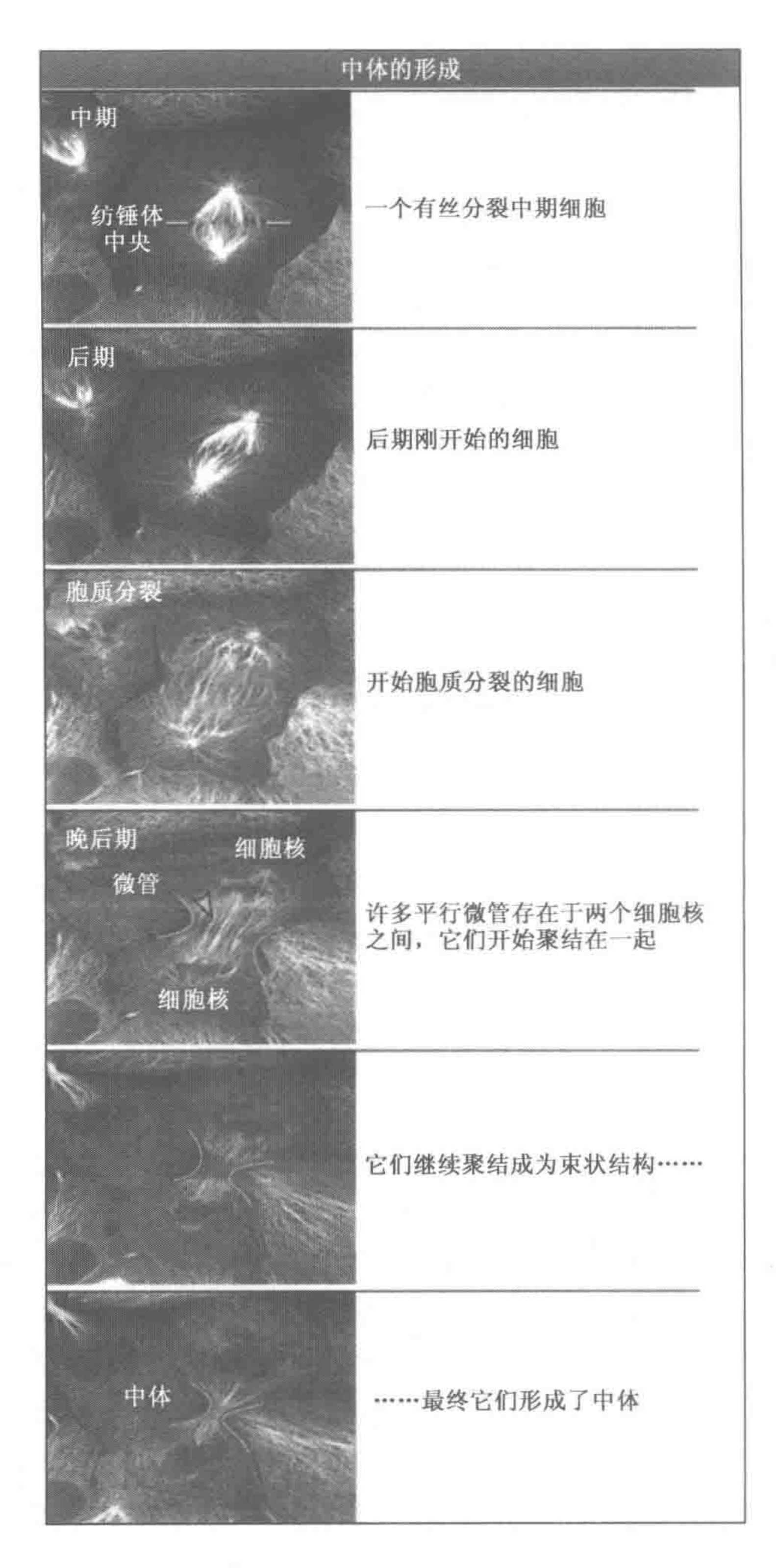


图 10.32　视频图展示了有丝分裂后期中体形成的过程。照片由 Massachusetts 大学（Amherst）的 Patricia Wadsworth 惠赠。

置。甚至还正在形成的时候，收缩环就开始收缩了，使细胞表面开始凹陷，胞质分裂沟开始形成。随着收缩环的不断收缩，凹陷逐渐变为环绕细胞的深沟。这个分裂沟最终缢开细胞形成两个裂片，这两个裂片由一个很细的胞质桥连接，这个桥包含的物质比中体还要少。在上述过程之后就是最终的分离或“切断”，细胞通过一个不可逆的阶段，胞质桥将断裂，形成两个独立的子细胞。

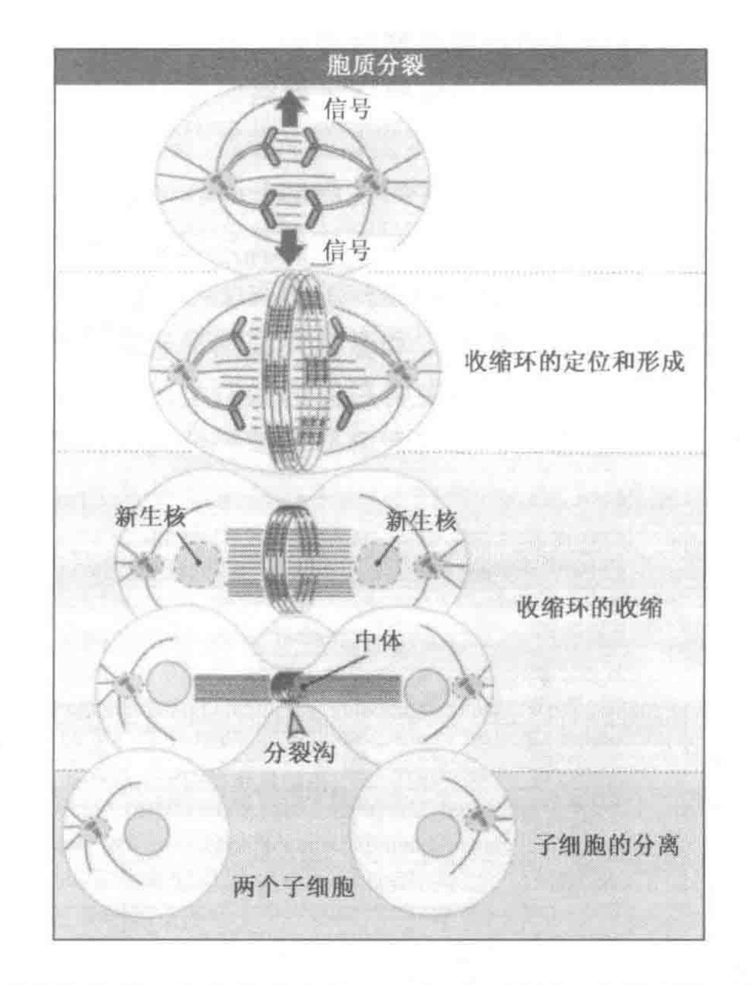


图 10.33　胞质分裂的各阶段。分离的染色体发出信号，诱导了收缩环在细胞表皮层形成。随即，收缩环迅速开始了收缩。然后，收缩环继续收缩着，直到它变成围绕着中体的致密结构，使正在分裂的细胞的两半被很细的桥连接。桥的破坏是两个新细胞完全分开。有丝分裂过程中这些阶段都是连续的，中间并没有停顿。

10.21　收缩环的形成需要纺锤体和纺锤线干体

关键概念

- 有丝分裂纺锤体的定位决定了收缩环形成的位置。
- 有丝分裂纺锤体定位通过星体微管和相关的细胞皮层的相互作用得以实现。
- 在细胞后期中平行排列的微管束称为纺锤线干体，它位于两组分离的染色体之间。
- 随着后期的进行，干体收缩成一个大的束状结构，叫做中体。
- 干体向细胞皮层发送的信号引起收缩环的形成。

收缩环形成的位置是由有丝分裂纺锤体和细胞皮层相互作用决定的。在有丝分裂的早后期阶段，整个细胞皮层有能力支持收缩环和胞质分裂沟的形成，但是晚些时候则只局限在很小的区域内。有丝分裂纺锤体在决定收缩环发生位置方面的作用已经被实验证实。在这个实验中，操作者把有丝分裂后期细胞纺锤体的位置进行移动。如果一个有丝分裂后期细胞已经开始形成了一个收缩环，它的纺锤体被移动后将导致第二个收缩环出现在纺锤体的新位置。第一个收缩环将消失，只要纺锤体没有被再移动，细胞将会在新的位置处分裂。无论纺锤体移动的位置离原来位置多么远，都会出现上述结果。但是，

如果纺锤体在有丝分裂后期的某个特定时刻后移动，就不再会产生上述结果。整个细胞皮层有能力响应有丝分裂早后期阶段的纺锤体，但是对晚后期阶段的则不能。

纺锤体本身在细胞内的定位是由星体微管决定的。**星体微管**从纺锤体两极放射出来，而且它们足够长，能够接触细胞大量的皮层部分。在动物细胞中，纺锤体的定位是由星体微管和锚定在细胞皮层内的动力蛋白间的相互作用决定的，如图 10.34 所示。因为动力蛋白移向星体微管的负端（处于纺锤体的极区），结果对每根微管产生了牵拉力量。在细胞特定的皮层区动力蛋白被定位和激活，细胞形状和从纺锤体两极发出的星体微管数目共同决定着纺锤体的定向。当发自星体的微管上的拉力达到机械平衡时，纺锤体的定位可能就确定下来了。然而，也存在着一些例外情况，纺锤体可以通过自己与细胞长轴平行的长轴得以定位。

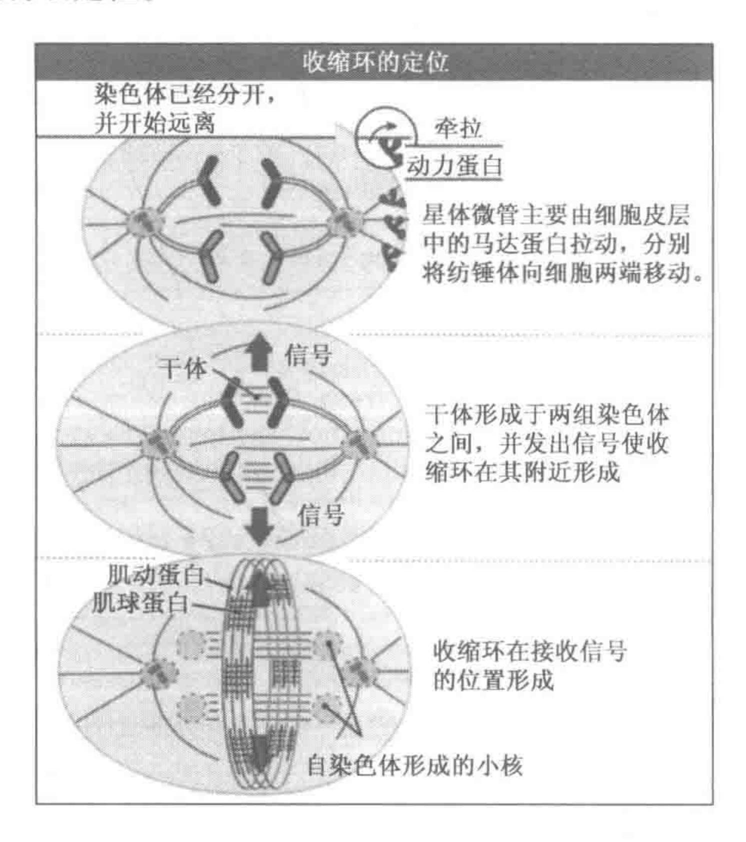


图 10.34　收缩环的定位是由一系列连续事件决定的。细胞中纺锤体的定位由星体微管与细胞皮层的动力蛋白相互作用决定。当纺锤体被定位时干体就形成了，它发出信号使收缩环在细胞邻近生物皮层形成。

在一些发展中的系统和组织中，胞质分裂可以导致大小不一的子细胞形成。这些不均等的分裂是由有丝分裂期中的纺锤体的突然移动产生的：在有丝分裂中后期，纺锤体迅速移动它的位置，使之更接近于细胞的某一侧。这一迁移的结果是胞质分裂沟形成的位置偏离细胞的正中央。什么机制调控纺锤体的这种移动？纺锤体是怎样移动到特定位置的呢？迄今为止这些问题都还不清楚。

纺锤体怎样决定了收缩环的位置呢？直到目前为止，大家都认为胞质分裂的位置是由纺锤体的星体决定的。很多实验已经得出这样的结论：胞质分裂发生在相邻的两个星体之间，不管星体之间是否通过一个有丝分裂纺锤体相连接。研究者提出，收缩环的必要因子聚集在细胞膜处，在该位置有大量的星体微管交互重叠。然而现在已经弄清楚，

收缩环的定位并不依赖于星体，相反，它依赖于另一种类型的微管结构，该结构在有丝分裂后期的早些阶段形成于分离的两组染色体之间。

当染色体分离时，许多小的微管束形成于中期染色体排列区域并沿着纺锤体分布。这些小的微管束被称为**干体（stem body）**或中间带微管束（midzone microtubule bundle），这些微管束可能是由有丝分裂后期B中随着中心体分离而从它们那里隔离来的微管聚集而成，也可能是由新的微管聚集而从头形成。每一个微管束都由双极性微管组成，而且背向极区的微管正端交互重叠于一个小区域内，这个区域位于微管束的中间位置。这些重叠区域定位在纺锤体两极间的正中央处，以至于微管束全部都被集中在中线上。每个微管束的重叠区都被特异化并且包含一套特异的蛋白质，其中包括依赖微管的马达蛋白。一个驱动蛋白类马达蛋白（MKLP1，mitosis kinesin-like protein 1）结合在背向极区的相邻微管上。它可能通过同时移动两根正端微管来影响干体的形成。存在于重叠区的另一个马达蛋白是CENP-E，在成为动粒成分之后以及在有丝分裂后期之前，它重新定位到该区域，如图10.35（见图版）所示。

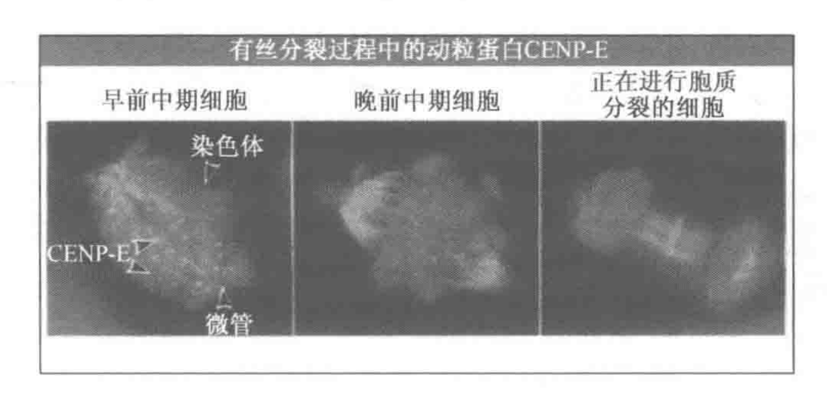


图10.35 一系列免疫荧光图片，展示了CENP-E是怎样在有丝分裂过程中变化的。在中期和中期之前它是动粒的组分且以分离的点状物存在。然而在后期的起始阶段它离开动粒而积累于一个狭窄的区域，这个区域恰好在纺锤体的赤道板上，有很多中间带微管交互重叠于此区域。CENP-E与DNA重叠时以紫色显示，与微管重叠时以橙色显示。照片由Wadsworth中心的Bruce F. McEwen惠赠。

随着胞质分裂的进行，干体收缩形成一个大的微管束，即**中体（midbody）**，它定位于两组分离的染色体之间（见图10.32）。像每一个干体一样，背向极体的微管交互重叠于中体的中心区域，而且它也是一个特异结构并包含大量不同类型蛋白质。

收缩环的形成需要干体，干体在决定收缩环的位置方面起着重要的作用。收缩环的聚集涉及大量蛋白质的组合，其中包括主要的结构蛋白成分肌动蛋白和肌球蛋白。这些蛋白质先被召募到细胞质膜下的某一位点，随后它们被组织到收缩环中。这些蛋白质的积累和组织需要在附近有干体存在。实验表明，如果干体的形成被阻止，肌动蛋白和肌球蛋白就不能聚集在任何位置，而且收缩环也不能形成。用实验来操作细胞，可以改变干体位置并使它接近有丝分裂纺锤体区域外的细胞皮层。这样的实验完成后，肌动蛋白和肌球蛋白就可以在任何接近干体的皮层区域聚集并形成收缩环。

需要指出的是，干体似乎主要是负责发出信号，这些信号可以刺激收缩环的形成。虽然有关分子机制仍然不清楚，但是这些信号很可能由特定区域产生，这些特定区域是微管正端聚集的干体中间处。在该区域存在一个蛋白质，它可以催化小GTP酶Rho的

活性。在许多其他细胞事件中，Rho 可以调节包含肌动蛋白的结构形成；干体连续的生产和释放有活性的 Rho 蛋白很可能导致肌动蛋白和肌球蛋白重新组织到收缩环中。

10.22 收缩环将细胞分割为两个

关键概念

- 收缩环的缢缩引起本身的收敛并环绕正在分裂的细胞表面形成一个分裂沟。
- 收缩环主要由肌动蛋白和肌球蛋白组成，它的收缩是由这些蛋白的相互作用驱动的。
- 收缩环的收缩需要来自干体或中体的信号。
- 在胞质分裂过程中需要大量的膜融合。

一旦收缩环的成分被召募和组装到正确的位置，它就开始执行把细胞质一分为二的任务。几乎在收缩环一开始形成的时候它就同时开始了收缩。收缩环不停地收缩来减小它的直径，直到把直径减小到只剩下一个小开口为止，这个小开口存在于分裂到一定程度的两个**“半细胞”**之间，每个“半细胞”都包含一个新形成的核（见图 10.33）。因为收缩环被附着到质膜的下面，所以它的收缩能够使细胞质膜在两个核之间向内塌陷，并在细胞的表面形成一个凹痕即胞质分裂沟。在许多单细胞生物和动物组织细胞中，分裂沟较宽，而且其两边的坡度也比较平缓，这使得细胞从表面看起来像个哑铃。在其他细胞特别是像海胆和青蛙这样的动物卵细胞中，收缩环呈现为一个非常陡峭而深陷的裂缝。有些情况中胞质分裂沟在细胞的一个面上形成，它通过从细胞的一面向另一面切割来分裂细胞而不是通过收缩。这些情况揭示了收缩环装置虽然主要以环状形式存在，但也有其他形式（如月牙形），它可以只围绕细胞延伸到中途而不是环绕一周，而且也能够收缩。

收缩环进行收缩的动力是由肌动蛋白和肌球蛋白提供的。像肌肉中肌节的收缩环是由交互重叠的肌球蛋白Ⅱ和肌动蛋白纤维组成的那样，收缩的动力由两种蛋白的相互作用和交替移动来产生。许多其他蛋白质也存在于收缩环中，但是数量很少。这些蛋白质起的作用是组织肌动蛋白和肌球蛋白或者控制它们互作的能力和引起收缩。然而，收缩环并不是一个简单的小型环状肌肉样结构。收缩环中的肌动蛋白和肌球蛋白纤维不会像肌肉中那样精确地排列，也不会形成肌节。收缩环也是一个高度动态的结构，如果药物阻断肌动蛋白的聚合，收缩环就会迅速地消失。收缩环的动力学本质可能正是它体现功能的根本，这也反映在收缩过程中收缩环的厚度一直保持不变上。随着收缩环直径不断减小，它的成分也在不断地丢失，在接近完成胞质分裂的时候收缩环的绝大多数成分都被释放掉了。

收缩环的收缩由延伸在分离中的两组染色体之间的微管控制。胞质分裂沟的形成需要干体的持续存在，可能是干体聚集为中体驱动了胞质分裂沟的产生。实验已经证实，即使药物阻断肌动蛋白聚合进而阻止收缩环的收缩，干体也仍然可以聚集成为一个大的微管束。

干体可以释放信号给收缩环进而使收缩环得以收缩。这些信号产生于每个微管束中间位置的微管重叠特异区域。胞质分裂沟的形成需要收缩环上一些成分的连续活性，其中包括 Aurora B 激酶。这些蛋白质在有丝分裂后期的起始阶段从着丝粒重新定位到干体的重叠区域。那么，它们怎样刺激胞质分裂沟的形成呢？它们是信号通路的一部分还

是干体形成所特需的呢？目前关于这些问题还不清楚。为什么这些蛋白质在关键的过渡环节从一个位置移动到另一个位置呢？在干体的形成和定位方式上，这些蛋白质的位置移动又暗示着什么呢？这些问题激励着研究者们去寻求答案。

直到正在分裂细胞的两半由包括中体的很细的桥相连之前，收缩环的收缩都在继续，胞质分裂沟都在进一步加深。这种桥的主要功能是控制胞质分裂的最终阶段，也就是两个子细胞最终完全分离的阶段。这种细胞桥可以维持很多小时，只有它被毁掉后胞质分裂才算完成。如果在后期染色体不能够成功地进行分离，将会很明显地出现有桥围绕一块染色质形成的局面。当发生染色体分离失败时，桥将在很多小时后也不会被毁掉，最终胞质分裂沟被解除掉进而形成双核细胞。在正常的细胞分裂中，桥的销毁有两条通路。在有些情况中，子细胞的背向迁移将导致桥的破坏；在另一些情况中，存在着一种特殊的机制——一些小泡释放到桥上进而融合和关闭分裂中细胞的两半之间的裂隙。不同的细胞在不同程度上使用着这两种机制。例如，对于不能移动的细胞来说，它们就不能依赖第一种机制。

除了在胞质分裂过程中发生的各种细胞骨架事件之外，大规模的细胞膜融合也在发生。对于将两个子细胞完全分开来说，一些膜融合事件的发生必然相当简捷。然而，对于膜融合事件发生的原因还不是很明确。如果一个球体或者圆柱被一分为二（在胞质分裂过程中这些情况都会发生），两个分割体的体积之和等于未分割时物体的体积。然而他们的表面积却大于未分割物体的表面积，如图 10.36 所示。这意味着在胞质分裂过程中将有大量的新的细胞质膜产生。这一过程在动物细胞中已进行了比较详细的研究。细胞内的小泡融合到细胞质膜上，就引起细胞表面积增大，不过，这些小泡主要是融合到胞质分裂沟的前沿后面。在两栖动物（如青蛙）的卵细胞中，这一过程体现得更加明显。这些卵细胞特别大，而且要尽可能快地进行多次连续的分裂。因为这一情况在时间上不会允许每个细胞周期有大量的新物质形成，所以每个卵中都储备了大量的小泡，在每次细胞分裂时它们可以添加到细胞质膜上。

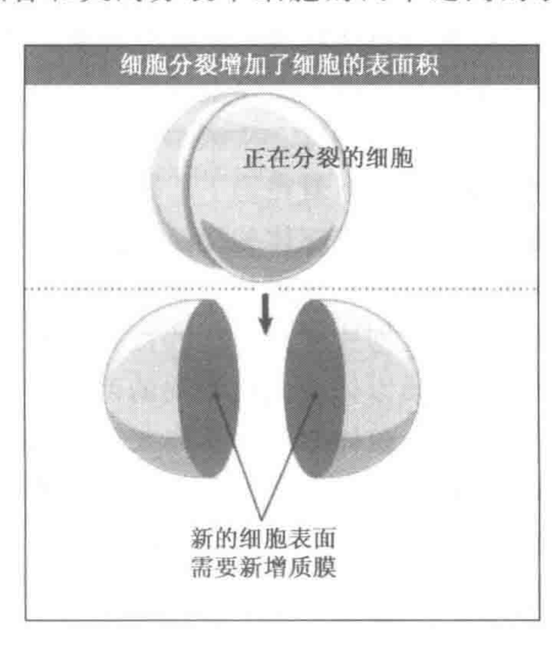


图 10.36　通过细胞分裂形成了子细胞相接触的表面，它的总面积比母细胞的面积大。胞质分裂过程中需要添加新的质膜。

10.23　细胞分裂时非核细胞器的分离是一个随机事件

关键概念

- **在有丝分裂中许多细胞的内膜崩解，并以小泡形式被分配到子细胞之中。在有丝分裂完成后，这些小泡再重新形成细胞器。**

细胞的分裂不仅仅是把复制的中心体和染色体分离到子细胞中，每个新的子细胞也必须继承足够的原来的细胞质和细胞器来确保它的活性。对于很多细胞器来说，完成分

配到子细胞的过程主要是通过先将细胞器裂解为大量的小亚基，然后小亚基任意地分散于整个母细胞质中。一般来说，这些细胞器的裂解和分散主要由有丝分裂调节激酶 cyclin B 和 CDK1 的活性来控制。

有丝分裂几乎使一个细胞的所有结构成分和膜结构的细胞器全部都受到影响。在有丝分裂过程中，内膜系统成分（包括高尔基体装置、光面和粗面内质网和核膜等）全部破碎，产生的碎片常常结合着发自两个星体的高度动态微管随机地分散于整个细胞中。除了微管之外（微管重新组装成纺锤体结构），细胞骨架系统成分也要发生明显的解聚。肌动蛋白和中间纤维的解聚，释放出的亚基分布于整个细胞中。在绝大多数情况下细胞骨架的崩解可以诱导细胞形状变圆，成为球形。有丝分裂早期这种基本的形态学变化无疑将有利于细胞成分分散到整个细胞空间。

在有丝分裂开始时没有解聚或裂解的细胞器是线粒体。在有丝分裂中，线粒体在结构上好像没有受到影响，没有崩解，因为这些线粒体已经以许多小的拷贝形式存在。在整个细胞周期进行中每个线粒体作为一个独立体来发挥作用，而在一个细胞中存在着数百或数千个线粒体。从根本上说，ATP 所发挥的作用在细胞中已经被广泛地片段化和充分地分散了。对比之下，高尔基复合体仅仅以一种单一拷贝形式存在于动物细胞中，因此为了把高尔基体的功能分配到子细胞中，有丝分裂中需要高尔基体的分解。

有丝分裂早期发生了很多解聚事件，在细胞进入有丝分裂后期时，它们的大多数成分以多拷贝形式存在，这些成分随机地分配到整个细胞空间当中。在胞质分裂完成之后，细胞质以体积大致相同的两份被分开，两个子细胞中的每一个中都包含一个中心体、一组染色体和与母细胞大致等量的细胞器和细胞骨架系统前体。当 cyclin B 和激酶 CDK1 被诱导为非活性状态时，细胞将退出有丝分裂状态，在这个过程中细胞内部体系的裂解将逆转，并且它们将重新形成。

10.24 展望

理解有丝分裂是怎样进行的探索并不是简单的学术挑战。与许多疾病起源相关的遗传学变化通常与有丝分裂过程中发生的错误密切相关。随着现代遗传学和分子工具的发展，染色体分离和胞质分裂所涉及的新分子的发现已经变得比较容易了。关键是要研究这些分子的功能，这些分子怎样共同完成某一特定的事件，有丝分裂过程中的众多事件是怎样有机结合进而影响一个最基本的生命过程的。

我们将进一步研究每一个参与有丝分裂过程的蛋白质是怎样工作的。除了活体细胞中蛋白荧光标记方法外，高度复杂的成像系统的发展也将有利于更加精确地观察纺锤体成分是怎样相互作用的。加上细胞中特异蛋白沉默或剔除方法（如 RNAi）的广泛应用，这些技术将有利于更加清楚地观察蛋白质是怎样在影响细胞进入有丝分裂期或在整个分裂期的行为的。毫无疑问，一个重点领域将聚焦于中心体复制背后的分子机制——它是怎样与 DNA 复制相协调的，细胞是怎样控制这么重要的细胞器数目的。现在已经清楚，在许多癌细胞发生的早期发生了中心体的过量产生现象。超量的中心体将导致多极纺锤体和非整倍性细胞的形成。在进一步的研究中，重要的内容是确定中心体是怎样过量产生的，以及这种过量产生可被追溯为引发肿瘤发生方面的起因。

接下来另一个令人兴奋的研究领域是在分子水平上纺锤体组装检验点是怎样发挥作

用的。仅由一个动粒产生的信号是怎样在整个细胞中抑制有丝分裂后期启动的呢？这个检验点的功能异常也直接导致了非整倍体的形成及其灾难性结果，包括肿瘤的形成。许多癌症细胞不含有效工作的纺锤体组装检验点，因此，研究后期等待信号怎样抑制有丝分裂后期促进复合体，将有力于研发能杀死被选择的处于分裂状态的细胞的药物。

另一个重要的研究领域无疑是探索微管亚基变迁怎样发生和它在染色体定位及运动方面的作用。这种变迁是由于被锚定在纺锤体基质中的马达蛋白沿着微管移动引起的，还是由于只在微管末端锚定的特异蛋白引起的？动粒上的向极力更大程度上是由微管亚基变迁产生，而不是由锚定在动粒上的微管马达蛋白产生的吗？在动粒上发生了哪些事件，它们之间是怎样相互协调的呢？对这些问题的探索有利于深入了解染色体是怎样被定位到纺锤体的赤道板上的。

最后需要承认的是，我们还没有完全了解细胞是怎样控制有丝分裂期的进入的。有一点非常清楚：当 DNA 被损伤后，细胞不能便进入有丝分裂期。然而人们越来越清楚地认识到，除了基因组的完整性外还有很多方面的可变因素也控制着有丝分裂期的进入。对于每一个细胞来说，看来都存在一个检验点信号通路。一些信号通路控制着微管的功能，另外一些信号通路则可以被各种药物和环境胁迫所刺激。对这些信号通路和它们怎样阻止细胞进入有丝分裂期的理解将有利于在预防和治疗多种灾难性疾病方面取得较大的进展。

10.25 总结

细胞分裂的过程是生物医学研究中的一个被深入探究的领域，因为有丝分裂中的错误可以导致像癌症所涉及的那样的非整倍细胞的形成和遗传不稳定性的发生。有丝分裂通过两种过程发生——核分裂和胞质分裂。**核分裂（karyokinesis）**可以将复制了的染色单体平均分配到两个子细胞核中。在核分裂将近结束时，胞质分裂在两个新形成的细胞核之间将细胞及其细胞质分开。

有丝分裂装置纺锤体通过移动染色体和限定两分细胞的赤道板位置来介导核分裂和胞质分裂。纺锤体这种双极性结构主要由微管、微管结合蛋白（包括马达蛋白）和结构蛋白组成。成熟纺锤体的微管分两种：一种是紧密连接在姐妹动粒上的微管，这些姐妹动粒定位在面对纺锤体极的每个染色体上。另一种微管是在纺锤体中游离端的。微管的动力学特性对纺锤体的形成和功能非常重要。

有两种不同机制奠定了动粒运动的基础，因而也奠定了它们结合的染色体指向纺锤体极的运动基础。其中一种力量产生于动粒所结合的微管的缩短，这源于纺锤体极区微管亚单位的删除；另一种力量涉及动粒结合的微管马达蛋白。在一些细胞（例如脊椎动物细胞）中，这些机制是联合发生的。

一个复杂的**细胞周期检验点（checkpoint）**的调控功能对中-后期过渡起着调控作用，直到所有动粒都稳定地与纺锤体附着。当检验点关闭时，一系列生物化学变化将导致姐妹染色单体分离、纺锤体结构解散和分离的染色体组之间纺锤线干体（stem body）的形成。正是干体的作用起始了胞质分裂过程。

参考文献

10.1 导言

综述

Flemming, W., 1879. *Archiv fur Mikroskopische Anatomie* (vol. 18).

10.2 有丝分裂是一个分阶段事件

综述

Pines, J., and Rieder, C. L., 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* v. 3 p. E3–E6.

10.3 有丝分裂需要纺锤体（一种新型亚细胞装置）的形成

综述

Rieder, C. L., and Khodjakov, A., 2003. Mitosis through the microscope: Advances in seeing inside live dividing cells. *Science* v. 300 p. 91–96.

研究

Inoue, S., 1953. Polarization optical studies of the mitotic spindle. I. The demonstration of spindle fibers in living cells. *Chromosoma* v. 5 p. 487–500.

10.4 纺锤体的形成和功能依赖于微管及其结合的马达蛋白的动力学行为

综述

Kline-Smith, S. L., and Walczak, C. E. 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: Refocusing on microtubule dynamics. *Mol. Cell* v. 15 p. 317–327.

Scholey, J. M., Brust-Mascher, I., and Mogilner, A., 2003. Cell division. *Nature* v. 422 p. 746–752.

研究

Mitchison, T. J., 1989. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: Evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* v. 109 p. 637–652.

10.5 中心体是微管的组织中心

综述

Boveri, T., 1888. Zellenstudien, II. Fischer.

10.6 中心体在DNA复制的相应时期得以再生

综述

Bornens, M., 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 25–34.

Nigg, E. A., 2002. Centrosome aberrations: Cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer* v. 2 p. 815–825.

Pazour, G. J., and Rosenbaum, J. L., 2002. Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.* v. 12 p. 551–555.

Sluder, G., and Nordberg, J. J., 2004. The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 49–54.

研究

Tsou, M. F., and Stearns, T., 2006. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* v. 442, p. 947–951.

10.7 纺锤体形成于原先分开的两极星体的相互作用

综述

Meraldi, P., and Nigg, E. A., 2002. The centrosome cycle. *FEBS Lett.* v. 521 p. 9–13.

研究

Zhai, Y., Kronebusch, P. J., Simon, P. M., and Borisy, G. G., 1996. Microtubule dynamics at the G2/M transition: Abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J. Cell Biol.* v. 135 p. 201–214.

10.8 纺锤体的稳定需要染色体但可以在无中心体的条件下"自我组装"

综述

Heald, R., and Walczak, C. E., 1999. Microtubule-based motor function in mitosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 9 p. 268–274.

Hyman, A., and Karsenti, E., 1998. The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J. Cell Sci.* v. 111 (Pt. 15) p. 2077–2083.

研究

Dionne, M. A., Howard, L., and Compton, D. A., 1999. NuMA is a component of an insoluble matrix at mitotic spindle poles. *Cell Motil. Cytoskeleton* v. 42 p. 189–203.

Faruki, S., Cole, R. W., and Rieder, C. L., 2002. Separating centrosomes interact in the absence of associated chromosomes during mitosis in cultured vertebrate cells. *Cell Motil. Cytoskel.* v. 52 p. 107–121.

Khodjakov, A., Cole, R. W., Oakley, B. R., and Rieder, C. L., 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Current Biol.* v. 10 p. 59–67.

10.9 着丝粒是染色体上的包含动粒的特殊区域

综述

Carroll, C. W. and Straight, A. F., 2006.

Centromere formation: From epigenetics to self assembly. *Trends Cell Biol.* v. 16 p. 70–78.
Nicklas, R. B., 1971. Mitosis. *Adv. Cell Biol.* v. 2 p. 225–297.

研究

Earnshaw, W. C., and Bernat, R. L., 1991. Chromosomal passengers: Toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma* v. 100 p. 139–146.

10.10 动粒在有丝分裂前中期起始点形成，包含微管马达蛋白

综述

Rieder, C. L., 1982. The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber. *Int. Rev. Cytol.* v. 79 p. 1–58.

10.11 动粒捕捉和稳定了与其结合的微管

综述

Kline-Smith, S. L., Sandall, S., and Desai, A., 2005. Kinetochore–spindle microtubule interactions during mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 17 p. 35–46.

研究

King, J. M., and Nicklas, R. B., 2000. Tension on chromosomes increases the number of kinetochore microtubules but only within limits. *J. Cell Sci.* v. 113 pt. 21 p. 3815–3823.
Maiato, H., Rieder, C. L., and Khodjakov, A., 2004. Kinetochore–driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J. Cell Biol.* v. 167 p. 831–840.
Rieder, C. L., and Alexander, S. P., 1990. Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells. *J. Cell Biol.* v. 110 p. 81–95.

10.12 动粒附着的差错有矫正机制

综述

Ault, J. G., and Rieder, C. L., 1992. Chromosome mal–orientation and reorientation during mitosis. *Cell Motil. Cytoskel.* v. 22 p. 155–159.
Cimini, D., and Degrassi, F., 2005. Aneuploidy: A matter of bad connections. *Trends Cell Biol.* v. 15 p. 442–451.
Mazia, D., 1961. *The Cell* (vol. 3). San Diego: Academic Press.

10.13 动粒纤维必须能伸能缩以满足染色体运动的需要

研究

Gordon, M. B., Howard, L., and Compton, D. A., 2001. Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J. Cell Biol.* v. 152 p. 425–434.
Maiato, H., Khodjakov, A., and Rieder, C. L., 2005. Drosophila CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibers. *Nat. Cell Biol.* v. 7 p. 42–47.
Mitchison, T., Evans, L., Schulze, E., and Kirschner, M., 1986. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell* v. 45 p. 515–527.

10.14 驱动染色体向两极运动的力量产生于两种机制

综述

Nicklas, R. B., 1971. Mitosis. *Adv. Cell Biol.* v. 2 p. 225–297.

研究

Ganem, N. J., Upton, K., and Compton, D. A., 2005. Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. *Curr. Biol.* v. 15 p. 1827–1832.
Mitchison, T. J., and Salmon, E. D., 1992. Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis. *J. Cell Biol.* v. 119 p. 569–582.

10.15 染色体的中板集合涉及作用在动粒上的拉力

研究

Kapoor, T. M., Lampson, M. A., Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E. D., McEwen, B. F., and Khodjakov, A., 2006. Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* v. 311 p. 388–391.
Mitchison, T. J., and Salmon, E. D., 1992. Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase–A in newt lung cell mitosis. *J. Cell Biol.* v. 119 p. 569–582.
Ostergren, G., 1945. Equilibrium of trivalents and the mechanism of chromosome movements. *Hereditas* v. 31 p. 498–499.

10.16 染色体的中板集合也受沿着染色体两臂的作用力和姐妹动粒活化的影响

综述

Rieder, C. L., and Salmon, E. D., 1994. Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J. Cell Biol.* v. 124 p. 223–233.

研究

Skibbens, R. V., Skeen, V. P., and Salmon, E. D., 1993. Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: A

push–pull mechanism. *J. Cell Biol.* v. 122 p. 859–875.

10.17 动粒控制了中后期转变

综述

Malmanche, N., Maia, A., and Sunkel, C. E. 2006. The spindle assembly checkpoint: Preventing chromosome mis–segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.* v. 580 p. 2888–2895.

Nasmyth, K., Peters, J. M., and Uhlmann, F., 2000. Splitting the chromosome: Cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* v. 288 p. 1379–1385.

研究

Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrassi, F., and Salmon, E. D., 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J. Cell Biol.* v. 153 p. 517–527.

Hoyt, M. A., Totis, L., and Roberts, B. T., 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* v. 66 p. 507–517.

Li, R., and Murray, A. W., 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* v. 66 p. 519–531.

Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A., and Sluder, G., 1995. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* v. 130 p. 941–948.

10.18 后期包括两个时相

研究

Mastronarde, D. N., McDonald, K. L., Ding, R., and McIntosh, J. R., 1993. Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *J. Cell Biol.* v. 123 p. 1475–1489.

McNeill, P. A., and Berns, M. W., 1981. Chromosome behavior after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells. *J. Cell Biol.* v. 88 p. 543–553.

10.19 分裂末期发生的变化可导致细胞脱离有丝分裂状态

综述

Murray, A. W., and Kirschner, M. W., 1989. Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* v. 246 p. 614–621.

研究

Brito, D. A., and Rieder, C. L. 2006. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* v. 16 p. 1194–1200.

Wheatley, S. P., Hinchcliffe, E. H., Glotzer, M., Hyman, A. A., Sluder, G., and Wang, Y. L., 1997. CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis *in vivo*. *J. Cell Biol.* v. 138 p. 385–393.

10.20 在胞质分裂过程中，细胞质分成两个部分使两个新的子细胞得以形成

综述

Glotzer, M., 2001. Animal cell cytokinesis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* v. 17 p. 351–386.

10.22 收缩环将细胞分割为两个

综述

Rattner, J. B., 1992. Mapping the mammalian intercellular bridge. *Cell Motil. Cytoskeleton* v. 23 p. 231–235.

研究

Mullins, J. M., and Biesele, J. J., 1977. Terminal phase of cytokinesis in D–98s cells. *J. Cell Biol.* v. 73 p. 672–684.

10.24 展望

综述

Bulavin, D. V., Amundson, S. A., and Fornace, A. J., 2002. p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 12 p. 92–97.

梁前进　译

第11章 细胞周期调控

Srinivas Venkatram 和 Kathleen L. Gould
Vanderbilt University School of Medicine，Nashville，TN
Susan L. Forsburg
University of Southern California，Los Angeles，CA

本章概要

11.1 导言

关键概念

- 一个细胞包含了在一个细胞分裂周期中复制其自身所需的所有信息。
- 真核细胞分裂周期（细胞周期）由一套有序的事件组成，这些事件使原有的一个细胞产生出两个子细胞。
- 细胞周期被划分为不同的时期，在这些不同时期中有不同的事件发生。
- 一个细胞染色体的复制和染色体的分离是细胞周期中两个重要时期。

Theodor Schwann（1810～1882）和 Matthias Schleiden（1804～1881）提出的“细胞学说”成为整个生物学的核心理论，该学说提出“细胞是由已存在的细胞产生

的”。新细胞不是由当时广泛认可的某些自发形式产生的，而是通过分裂过程由一个细胞分裂为两个细胞。在单细胞生物中，每次分裂都会产生一个完全新的、独立的生物体。在大的多细胞生物中，由单个细胞起始构造成一个生物体需要数以千次的细胞分裂。在这个生物体的生命过程中，需要更多的分裂来补充其生命过程中损失的细胞。

图 11.1 显示细胞繁殖是通过一个称为**细胞周期**的高度有序的系列事件来完成的。核 DNA 在 **S 期**复制。复制的染色体组在 **M 期**分离（有丝分裂），这期间有丝分裂纺锤体形成并经历一系列精细的运动，最终染色体均匀分配到细胞相对应的两端。胞质分裂使两个独立的细胞形成，这一过程通常被认为是 M 期的组成部分。这些内容在第 10 章中有详尽论述。

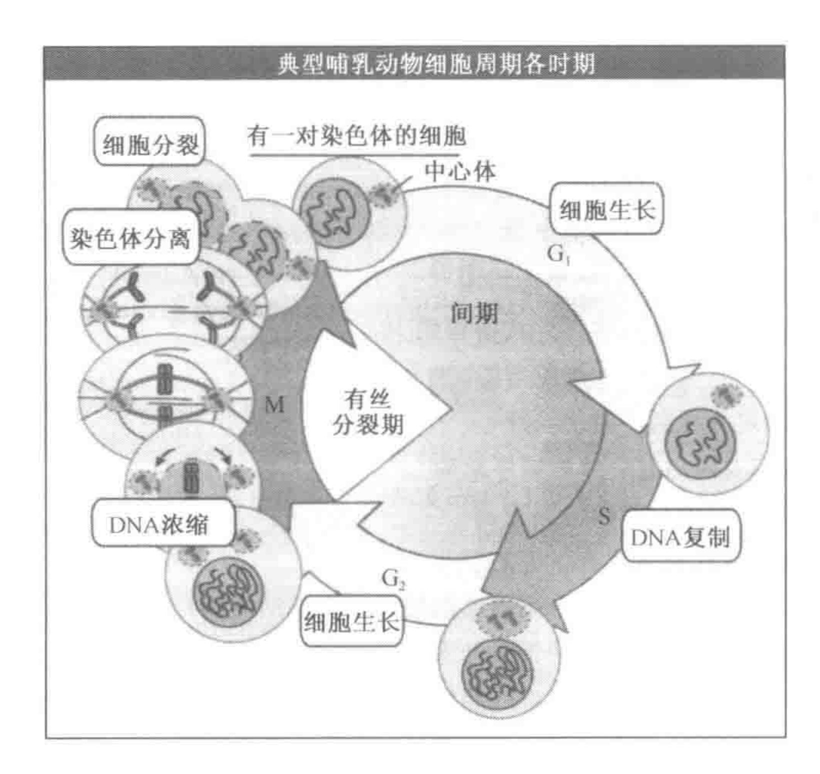


图 11.1　这个周期持续约 24h。DNA 复制期（S）和有丝分裂期（M）被间期（G_1 和 G_2）分隔。染色体在有丝分裂之前一直存在于核被膜内。中心体在有丝分裂过程中是有丝分裂纺锤体的组织中心或两极，并在 S 期被复制。在每个中心体的中心包括两个圆桶状的中心粒。

在大多数细胞中，S 期和 M 期被间期分开：间期 1（G_1）在一个细胞周期的 M 期结束和下一个细胞周期的 S 期之间，间期 2（$\mathbf{G_2}$）在 S 期和同一个周期的 M 期之间。这些间期有着明确的作用，包括给出细胞生长时间（即合成质量加倍所需的所有成分），保证细胞周期每个主要事件在下一个开始前有时间完成。在某些特化的细胞分裂中，间期被略过，细胞只经过 S 期和 M 期。例如，许多胚胎细胞就是如此，这期间细胞很大，分裂时不需要增加质量。

细胞分裂周期并不是连续发生的。细胞周期的进入通常受控于细胞周围的环境条件，这些条件可以产生刺激或抑制信号。这些外部调控在各调控因素中是关键性的。例如，当资源不可利用，以致无法完成周期时，细胞将不会进入细胞周期。这对于多细胞动物的细胞来说通常并不是问题，但对于一个单细胞生物，没有可利用的充足营养而进入细胞周期将可能是灾难性的。一个动物细胞不顾周围的其他细胞的状态就进行连续分

裂，也相当于是灾难性的。生物体是共同协作的细胞共同体，这些协作包括严格调控细胞的分裂时间。这些调控即使在很小数量的细胞中紊乱，就可能导致癌症，癌症就是一种细胞分裂失控的疾病。

在细胞周期中，基本事件——复制 、分离和分裂——需要有序地进行的原因是明显的。例如，如果一个细胞的 DNA 还没有完全复制，就没有染色体组的分离。但是细胞是如何使它们有序发生的呢?

细胞周期的转换由一系列的蛋白质调控，它们形成了一个细胞周期中心调控体系。这个体系调控着 DNA 的复制和分离以及细胞的分裂，告诉它们什么时候执行各自的功能。**检验点**，涉及中心调控因子，它有两个重要目的。一是保证一个细胞周期事件在前一个事件没有完成前不能开始。二是使细胞周期的起始依赖于细胞周围的环境条件，正如之前所讨论的。图 11.2 显示了细胞周期中由细胞周期调控体系控制的主要点和检验点。

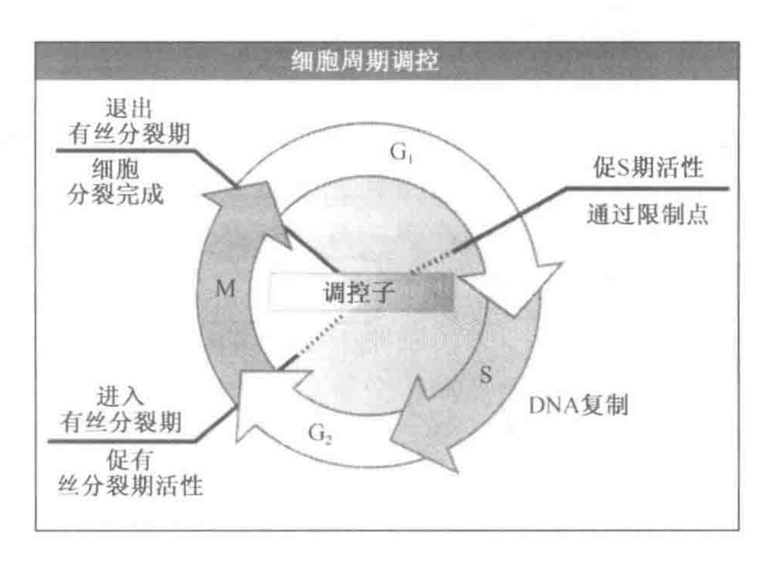


图 11.2　细胞周期中的主要转换由细胞周期调控体系调控。

本章讲述的是真核细胞的细胞周期中心调控体系和影响它的检验点。它们的组成是什么，使它们依次活化和失活的相互作用的本质是什么? 当需要时它们怎样在细胞外部进行调控? 如何启始细胞周期? 细胞周期调控体系是如何启动每个细胞周期事件所需的“机器”? 最后，这个体系出现故障将导致什么结果?

11.2　细胞周期分析的几个实验系统

关键概念

- 对多种生物的广泛研究丰富了我们对细胞周期调控的认识，每一研究又都有其长处和不足。
- 酵母细胞周期的遗传学分析鉴定出保守的细胞周期调控因子。
- 对多细胞生物中蛋白质复合体的生化分析充实了对单细胞生物的遗传学研究。
- 同步化的细胞群对分析细胞周期事件有重要的作用。

在我们继续讨论细胞周期是如何调控的这个问题之前，我们必须介绍研究者获得新发现的实验体系。它广泛涵盖从单细胞生物到两栖动物的卵再到人的组织培养细胞。每个体系对细胞周期研究都有不同的优势，总地来说，从一个体系中研究得到的结果可以

应用到大部分体系，因为细胞周期调控的基本机理经过进化仍然被保留下来。

某些吸引研究者的实验生物有自然同步化的细胞分裂。例如，海胆（*Arbacia punctulata*）、蛙（*Xenopus laevis*）和蛤（*Spisula salidissima*）的卵母细胞可通过适当的激素处理，诱导出同步化的**减数分裂**。激素刺激驱使卵母细胞从一个停滞的间期阶段（未成熟卵母细胞）到一个停滞的中期阶段，在此阶段等待受精。卵母细胞成熟和受精的阶段如图 11.3 所示。受精后，早期胚胎细胞分裂也是同步化的。同步化分裂使我们能够研究整个细胞群的行为，而不是单个细胞的行为。通过软体动物或两栖动物卵母细胞或卵（受精的卵）研究细胞周期的另一个优势是，它们可以收集到相当大的数量，为生化分析提供大量的材料。它们较大的体积也适合于如蛋白质和药物这样的生物分子注射，通过研究可以得知这些处理对细胞周期进程的影响。细胞质提取物可由这些卵母细胞或卵制备，并储存以备使用。这些提取物保留了按照正确的细胞周期顺序行使其功能

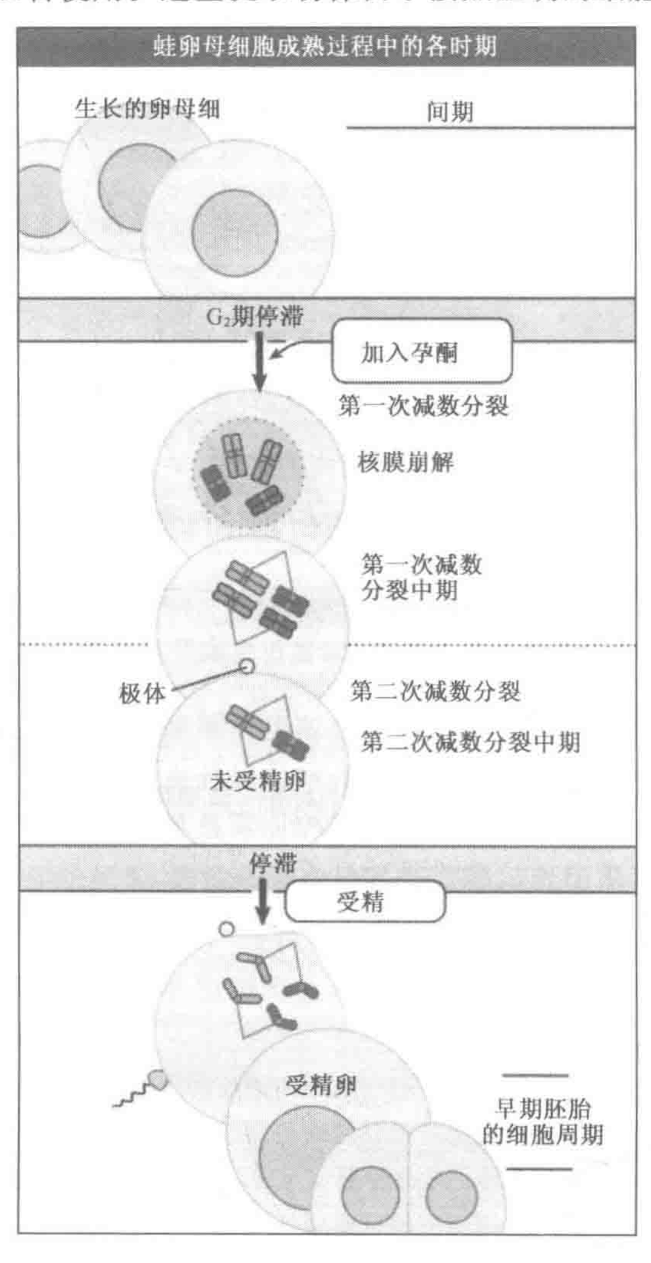


图 11.3　一个生长的卵母细胞在间期停滞。孕酮可以使卵母细胞通过第一次减数分裂转换，开始第二次减数分裂。在第二次减数分裂的中期出现停滞，等待着受精。受精解除了第二个细胞周期的停滞，然后受精卵经历胚胎的细胞周期。

的能力，包括组装围绕DNA的核被膜、复制额外的DNA、形成有丝分裂纺锤体。因此，细胞周期事件可以在一个试管中重演。这些提取物可以不止一次地循环。两栖动物和软体动物卵母细胞的这些特性已被广泛用来纯化和鉴别参与细胞周期进程的蛋白质，测试它们的水平，体外检测各种关于细胞周期调控的猜测。

芽殖酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）也广泛应用于细胞周期研究中。这些单细胞真核生物包含细胞周期的所有基本步骤，而且它们比多细胞真核生物有更多实验优势。在实验室条件下，它们更容易生长和操作，生长如此迅速以至于一个分裂周期的时间只需1～4h，适于采用简单的同步化方法，如大小选择和遗传控制。这些生物和多细胞真核生物细胞周期的一个最大不同是，在有丝分裂过程中酵母的核被膜并不解体；这些酵母经历了一个“封闭的”有丝分裂。尽管如此，细胞周期调控体系和检验点都是存在的。

顾名思义，一个芽殖酵母细胞通过间期生长形成的芽进行自我复制，在有丝分裂中从已存在的“母”细胞上分离，从而形成新的子细胞。芽的大小是细胞所处的细胞周期阶段的一个指标。例如，未出芽的细胞处于G_1期，反之，形成大芽的酵母细胞处于G_2或M期。图11.4显示的是一群芽殖酵母细胞。

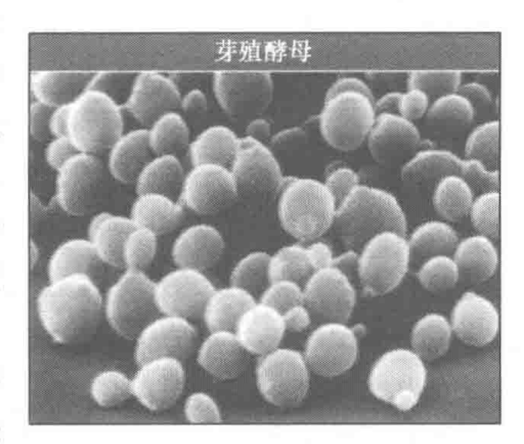


图11.4 芽殖酵母细胞的扫描电子显微照片。未出芽的细胞处于G_1期，而有大芽的细胞处于G_2期或M期。照片由California大学的Ira Herskowitz和Oregon大学的Eric Schabtach惠赠。

芽殖酵母和裂殖酵母都可以像单倍体细胞那样生长，只要能找到鉴别方法，在任一过程中出现缺陷的**条件性**功能缺失突变细胞都可以被分离出来。Hartwell和同事分离突变体的基础是将酵母从25℃的**许可生长温度**转移到37℃的非许可温度后，每个突变体克隆会停止生长，并以芽大小相同的形态死亡。生长停止在芽的大小相同现象表明突变体细胞在通过细胞周期的某个特殊阶段时是有缺陷的。例如，停止于一个大芽阶段的突变体，在染色体分离的有丝分裂过程中是有缺陷的。Hartwell和同事分离的**温度敏感型突变体**被命名为cdc（cell division cycle）（这个重要的筛选已在EXP：11-0001中描述）。温度敏感的cdc突变的概念由图11.5阐明。在鉴别调控不同细胞周期事件的基因上cdc筛选是高效的。温度敏感型突变的另一个有用的特征是整齐一致的停滞表型以及特定突变的可恢复性（一旦把它们从限制性条件转移到许可条件，就可以继续细胞周期），为同步化整个细胞提供了一个极好的方法。

不同于芽殖酵母，裂殖酵母细胞是圆柱状的，靠顶端延长生长，并通过一个中间隔膜来分裂。生长在丰富培养基的野生型种群，分裂细胞长度相当稳定，因此，*S. pombe*细胞长度是细胞周期阶段的一个很好指标。Nurse和同事们通过*S. pombe*细胞可检测长度为cdc突变的直观鉴定提供了一个理想的形态学上的标准，细胞并没有分开，但变得比野生型细胞更长。这也有助于分离“wee”突变体，这种突变体在细胞长度较短时就分裂。裂殖酵母细胞的野生型和突变体长度上的不同如图11.6所示。在一个单一的遗传基因座位内（$cdc2^+$），cdc和wee突变体的分离可产生一个设想，就是存

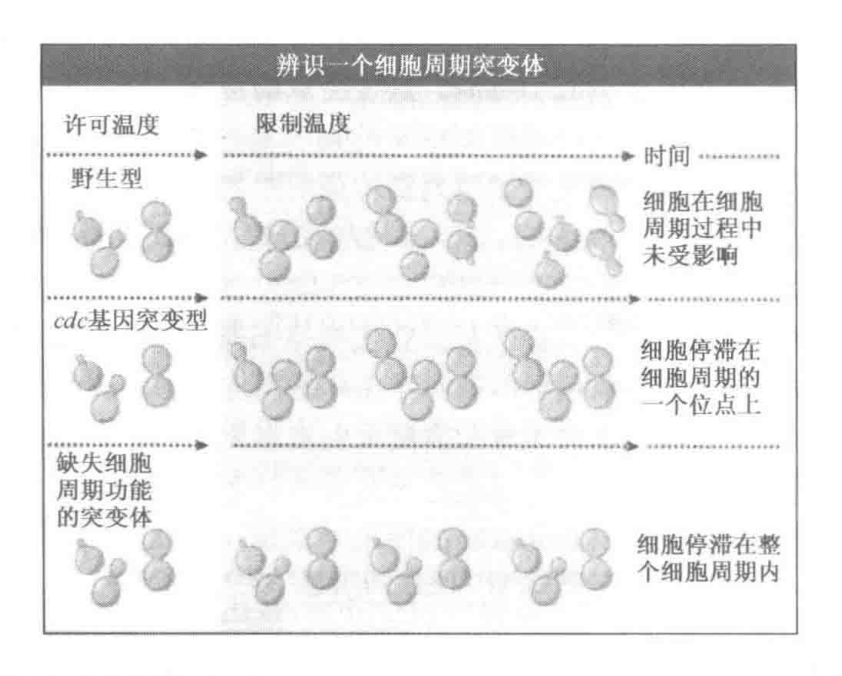


图 11.5　当生长在许可温度 25℃时，芽殖酵母（*S. cerevisiae*）是未出芽、小芽和大芽细胞的混合。然而，如果它们发生一个温度敏感的突变，例如调控有丝分裂的基因突变，则当把它们转移到限制温度 37℃时，它们会一致地停滞在大芽细胞。

在一个关键性的有丝分裂起始速率限制因子（关于这个发现的更多细节详见 EXP：11-0002）。在本章的后面，我们将更详细地讨论 cdc2。

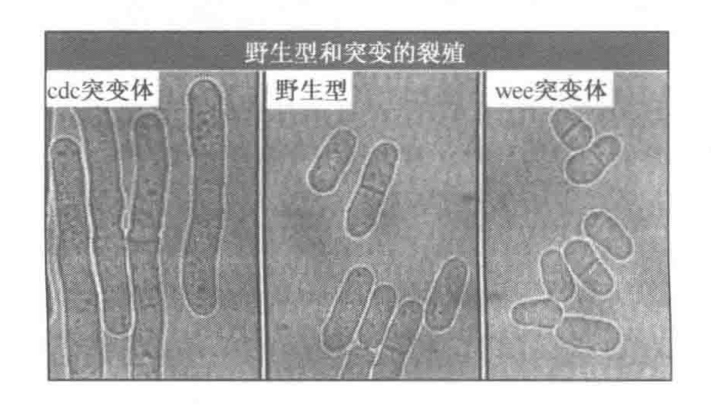


图 11.6　cdc 突变体不能分裂且比野生型酵母生长时间长。Wee 突变体比野生型（WT）酵母分裂得早，导致微小细胞的产生。这些表型表明了一个细胞周期调节因子的突变。这些是裂殖酵母（*S. pombe*）细胞 cdc 突变（左）、野生型（中）和 wee 突变（右）的 DIC 成像的照片。照片由 Vanderbilt 大学医学中心的 Joshua Rosenberg 和 Kathleen L. Gould 惠赠。

虽然不常使用，突变影响细胞周期调控的另两种实验生物可容易地被分离和研究，并在目前对细胞周期调控的理解上具有重要的贡献。它们是丝状菌类（*Aspergillus nidulans*）和果蝇（*Drosophila melanogaster*）。这些生物的早期细胞周期有着天然的同步性。无性生殖的 *A. nidulans* 孢子滞留在细胞周期的 G_1 阶段，并且前两个或三个分裂周期具有高度的同步性。*A. nidulans* 细胞周期研究提供了仔细分析细胞周期与进程中各个事件相协调的一个机会，以酵母作为模式生物对这些事件难以研究。同样的，果蝇胚胎的早期细胞分裂提供了在同一细胞质内观察同步核分裂周期的机会。这种特征，加之极好的遗传操作和发育模式知识，使果蝇成为一种用于研究细胞周期进程如何与发育协调的吸引人的实验生物。

哺乳动物组织培养细胞也是研究细胞周期调控的重要材料。在组织培养中用正常的原代培养细胞来研究哺乳动物的细胞周期是很理想的，原代培养细胞就是直接从生物体获得的未经任何遗传变异的细胞。尽管如此，正常原代细胞在培养中并不能无限增殖。

更确切地是，它们经过 25～40 次细胞分裂后就停止分裂并进入衰老期（本章稍后将讨论）。由于这个原因，从正常或肿瘤细胞获得的无限增殖化细胞系已被广泛地应用在细胞周期分析中。顾名思义，无限增殖细胞已经过遗传改变，培养中当提供适当的培养基和生长促进剂后，它们会无限分裂。虽然我们应该清楚这没有完全反映出细胞在生物体中的性质，但无限增殖细胞系，如 HeLa，已被证明对细胞周期分析是非常有价值的。通过各种抑制 DNA 复制或有丝分裂的药物或大小选择方法它们容易被同步化，它们也适于生化和细胞学研究。

实际上，哺乳动物细胞融合实验为检验点调控的概念和细胞周期各事件的协调奠定了基础。这些实验包括来自细胞周期不同时期（G_1、S、G_2、M）的融合细胞。与对细胞周期调控的理解相对应，实验表明一个 S 期细胞和一个 G_1 期细胞融合可以加快 G_1 期核进入 DNA 复制。据此结果可推测，S 期促进因子可以在融合的 G_1/S 细胞的细胞质中转运。

有丝分裂的细胞和 G_1、S 或 G_2 期细胞融合对影响细胞周期进程的主要因子有了重要的认识。在任何情况下，间期细胞的染色体都会过早地凝集，细胞进入一个假有丝分裂状态。这些观察表明，细胞中存在一个对其他状态起支配作用的有丝分裂诱导因子，它可以诱导染色体从细胞周期的任何阶段进入凝集状态。这种活性在所有真核细胞中都存在，现已从许多类型的细胞中纯化并得知其特征。

从这些实验中也发现当 G_2 期细胞与 S 期细胞融合后，G_2 期核并不抑制 S 期细胞核中正在进行的复制，而 G_2 期核也并不开始复制其自身的 DNA。由这个观察产生出一种假设，DNA 只允许复制一次，而且每个细胞周期只有一次（见图 11.22）。这些融合实验由图 11.7 阐明。

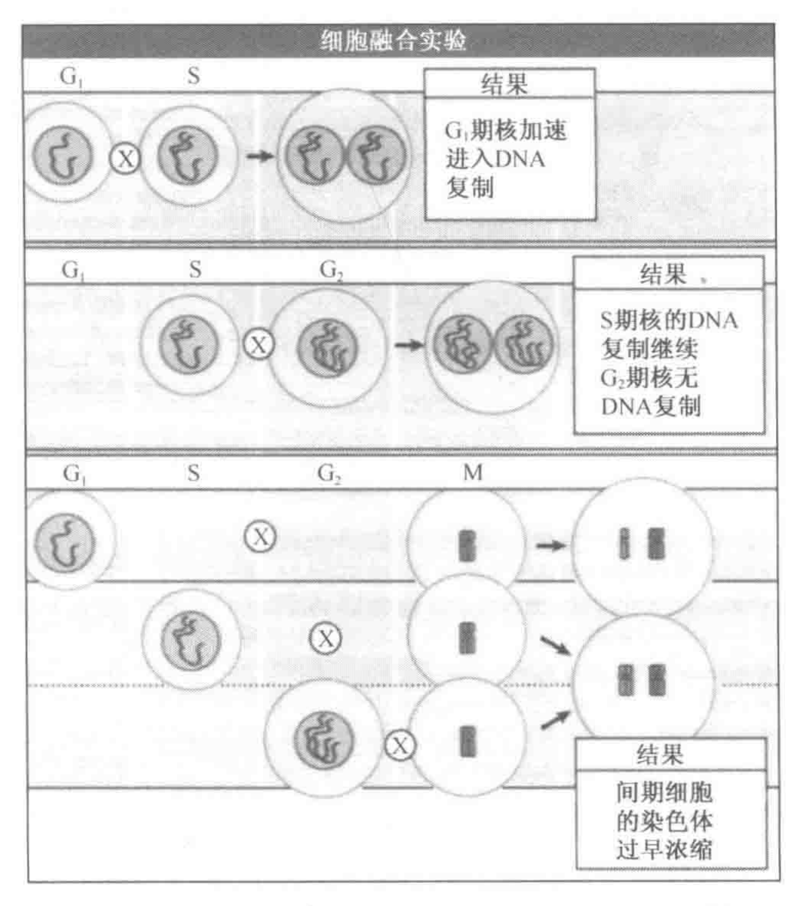


图 11.7　（上面一排）当一个 G_1 期哺乳动物细胞同一个 S 期细胞融合后，G_1 期核会加速进入 DNA 复制。（中间一排）当一个 S 期细胞同一个 G_2 期细胞融合后，G_2 期细胞并不复制它的 DNA，也不抑制 S 期细胞中正在进行的 DNA 复制。也不进入有丝分裂。而是在它进入有丝分裂前，等待 S 期的核完成 DNA 复制。（下面一排）当一个间期哺乳动物细胞（G_1、S 或 G_2）同一个有丝分裂细胞融合，则间期细胞会立刻经历染色体浓缩，并进入一个假有丝分裂状态。这表明有丝分裂细胞具有一种有调控作用的促进有丝分裂的活性。

除了建立这些自主的细胞周期调控的重要原理，组织培养细胞系也使外部刺激如何调控细胞周期的研究成为可能，并在哺乳动物中促进了肿瘤抑制基因和致癌基因如何调控细胞生长和分裂的研究（见EXP：11-0003）。

最后，鼠基因敲除可以用于哺乳动物细胞周期基因功能的测定。这种方法可以揭示细胞周期蛋白在所有细胞周期中都是必需的，还是仅在特定组织的发育和功能上起作用。可以揭示一个哺乳动物体内一种特定的细胞周期蛋白的损失能否由另一种蛋白质代替，以及缺乏细胞周期调控子的哺乳动物是否更易发生疾病如癌症。

每种实验体系都有其优势和劣势。例如，蛙、蛤和海胆卵母细胞在生化研究上的便利性使其在体外重建细胞过程上比其他实验体系有更强优势。另一方面，酵母、真菌和果蝇遗传上的强大优势为细胞周期进程关键调控子的鉴定提供了方法。这些实验体系共同提供了细胞周期调控机理的丰富信息。

11.3 细胞周期需要不同事件间的协调

关键概念

- 检验点保证在进入有丝分裂前DNA复制正确完成，并在时间上维持S期和M期的协调。

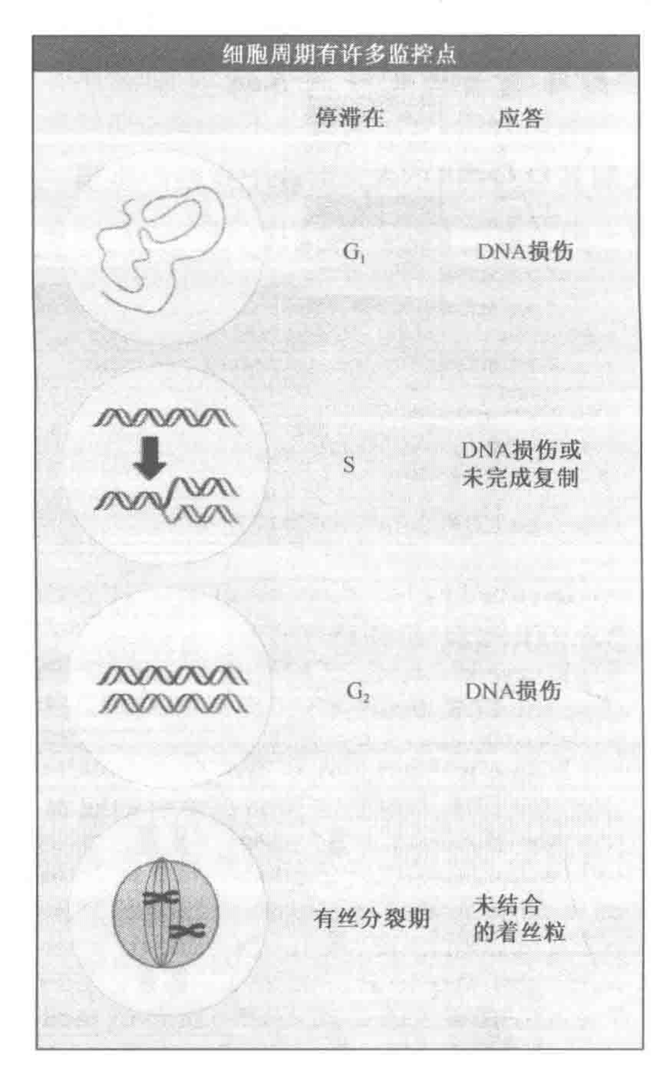


图11.8 细胞周期中的每一步都受到监控，异常时会阻止周期进行。

为了一个细胞周期进程的成功进行，几个关键事件发生的顺序必须完全正确，每个发生的事件彼此要相互联系。这种需求如何与细胞周期调控相结合？这部分将讨论检验点的概念，检验点监控每个细胞周期事件正确完成，以及控制从一个细胞周期阶段到另一个阶段的转换。

细胞周期中心调控体系在整个周期中不断接受反馈调控。只要有一个事件仍在进行中，信号将会传递到中心调控体系，从而阻止下一个事件的起始。只有一个事件成功完成后，这种抑制信号才会消除并允许中心调控体系进入下一个时期。

有若干这样的检验点存在。其中一个检验点能被DNA复制不完全或DNA损伤活化，并在问题解决之前阻止细胞进入有丝分裂。还有一个检验点在有丝分裂过程中起作用，它能监控染色体与有丝分裂纺锤体的附着，并在每条染色体未正确连接两极的纺锤体之前，阻止任何姐妹染色单体的分离。其他检验点监控细胞的状态，如有丝分裂纺锤体的位置，确保由有丝分裂产生的两个染色体组在胞质分裂后

均匀分配到子细胞中。在每种情况下，如果状态不合适，细胞周期会在细胞进入下个阶段前停止，提供修复缺陷的时间。因此，所有的检验点保证了每个子细胞获得一个正确且完整的染色体组，如图 11.8 所示。

11.4 细胞周期就是 CDK 的一个活性周期

关键概念

- CDK 是细胞周期主要的调控因子，它只有与细胞周期蛋白形成复合体时才有活性。
- 细胞周期蛋白的名称起源于细胞周期过程中蛋白质水平的周期性变化。
- 在细胞周期的不同时期，一种 CDK 可以与不同的细胞周期蛋白组合。

如 11.1 中所述，细胞周期由一个中心调控体系驱动。这个调控体系的关键组分是被称为**细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK）**的一个小的蛋白激酶家族。一个细胞周期蛋白依赖性激酶是两条多肽的复合体。一个是 CDK，能结合 ATP 并带有活性位点。不过，只有与**细胞周期蛋白（cyclin）**结合时才具有激酶活性。图 11.9 显示结合 cyclin 引起 CDK 构象的改变，从而允许底物进入催化中心。每个 CDK-cyclin 复合体的活性都呈周期性变化，即它只有在细胞周期的一个特定阶段才有活性，而在细胞周期的其他阶段处于失活状态。这个家族的不同蛋白激酶在周期中的不同阶段显示活性，有些在 G_1 期，有些在细胞 DNA 复制期，还有些在有丝分裂期。每种激酶在较短的时间内被激活，使大量蛋白质磷酸化，这样要么激活这些蛋白质继续完成细胞周期某个事件，要么抑制它们的活性阻止前面的某个细胞周期事件的重复。例如，起始有丝分裂的 CDK 使核纤层蛋白磷酸化，从而核被膜解体，同时磷酸化大量调控有丝分裂纺锤体装配的其他蛋白质。

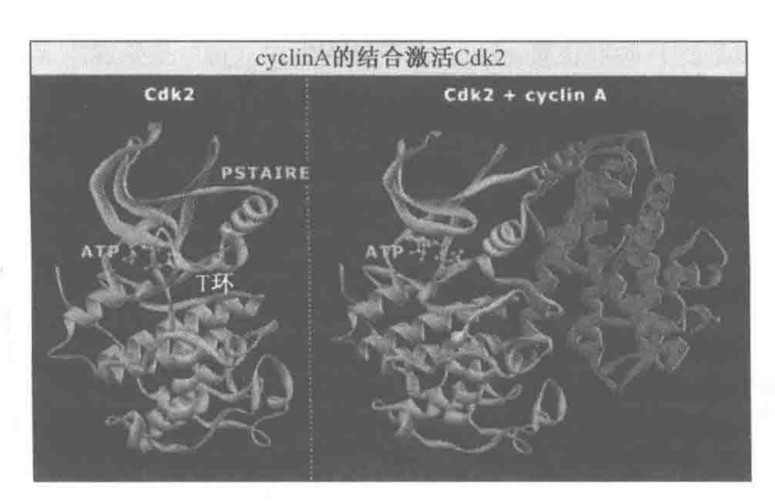


图 11.9 cyclin 与 CDK 的结合引起 CDK 构象的改变。T 环改变了位置，从而允许底物进入。此外，一些氨基酸侧链的再定位诱导了磷酸转移所必需的变化。图像来自 Protein Data Bank files1B38 和 1FIN。

CDK 最初是通过酵母 cdc 突变体的特性鉴定出来的。*S. pombe cdc2*$^{+}$ 基因的 DNA 测序显示，它与芽殖酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *CDC28* 基因是同源的。事实上，芽殖酵母基因在功能上可以替代裂殖酵母。换言之，当它转入一个裂殖酵母的 *cdc*^{ts} 突变体，突变体菌株可以在非许可温度下生长，证明这两种蛋白质为同源物，也就是，它

们有一种共同的功能。随后发现这些蛋白质具有蛋白激酶的功能。当一种与人相关的 *CDC2* 通过对 *S. pombe cdc2* 突变体补救分离出来时，我们发现这种激酶是进化上保守的有丝分裂调控因子。这个发现促进了细胞周期调控的保守蛋白质和真核细胞分裂调控的普遍方式的深入研究。在本章后面的部分我们将使用标准的名称“*Cdk1*”，而不是激酶基因组织特异的名称（*cdc2*、*CDC28* 或 *CDC2*）。

早在 20 世纪 80 年代，在研究海胆和蛤胚胎细胞分裂过程中，Tim Hunt 和同事们及 Joan Ruderman 实验室，注意到蛋白质的丰度呈周期性变化，蛋白质水平的降低与细胞分裂相对应。这些蛋白质后来被命名为 cyclin（见EXP：11-0004）。这种蛋白质丰度的周期性只有在检测单个细胞或同步化的细胞时才可能鉴定出来。

蛋白质水平的变化是很大的，这些蛋白质在间期合成并不断积累，在染色体分离进入后期时由于降解而突然消失，如图 11.10 所示。这两种蛋白质与细胞周期时相非常一致的出现和消失在每次细胞分裂中都会发生。Cyclin 显示功能的周期性意味着一种 CDK 可以与它的 cyclin 形成复合体，在每个细胞周期的一个短时期内被活化。

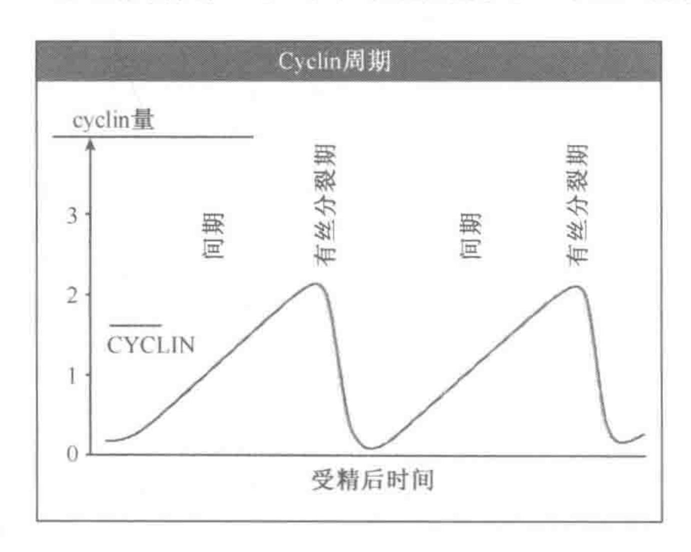


图 11.10　当科学家注意到高水平 cyclin 与胚胎中有丝分裂的开始相关时，他们发现了第一个 cyclin。有丝分裂后 Cyclin 的水平急剧下降。

以蛙为材料通过更精细的研究，在对 CDK 和 cyclin 作用认识上取得了新进展。成熟促进因子（MPF）被鉴定为具有能促进蛙卵母细胞减数分裂成熟的活性。随后对 MPF 的纯化和生化鉴定表明，它由 Cdk1 和一种 cyclin 组成。如图 11.11 所示，现已知 MPF 活性在每次减数分裂或有丝分裂中迅速地上升和下降。急速下降是由于 cyclin 蛋白水解，而急速上升部分是由于 cyclin 水平的升高。MPF 特性的阐明揭示出相似的蛋白质调控着所有真核细胞的细胞周期（见EXP：11-0005）。

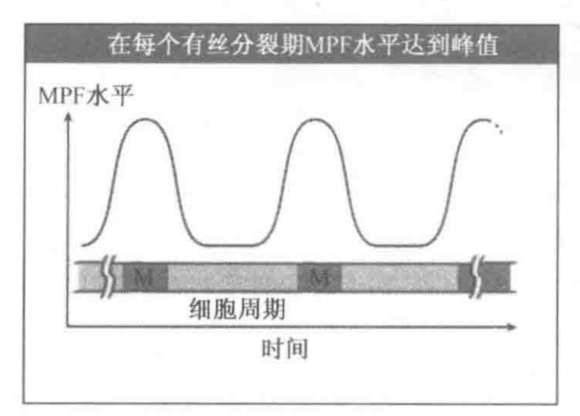


图 11.11　有丝分裂周期中 MPF 水平的变化表明它可能是有丝分裂的一个调节因子。

某些生物中，单一的 cyclin 和单一的 CDK 就足以组织细胞周期。例如，*S. pombe* 只有一种 CDK，也只有一个基本的 cyclin，这个

CDK-cyclin 复合体可以促进 G_1/S 和 G_2/M 时期的转换，如图 11.12 左半部分所示。这个结果与 CDK-cyclin 复合体只在一个转换中有活性的观点不同。既然这样，说明两个转换需要不同水平的 CDK-cyclin 活性：一个较低水平促进 S 期，一个较高水平促进有丝分裂，如图 11.13 所示。cyclin 的量随着时间逐渐增加，这个机制将通过 CDK-cyclin 复合体引起 S 期和有丝分裂按照正确顺序发生。

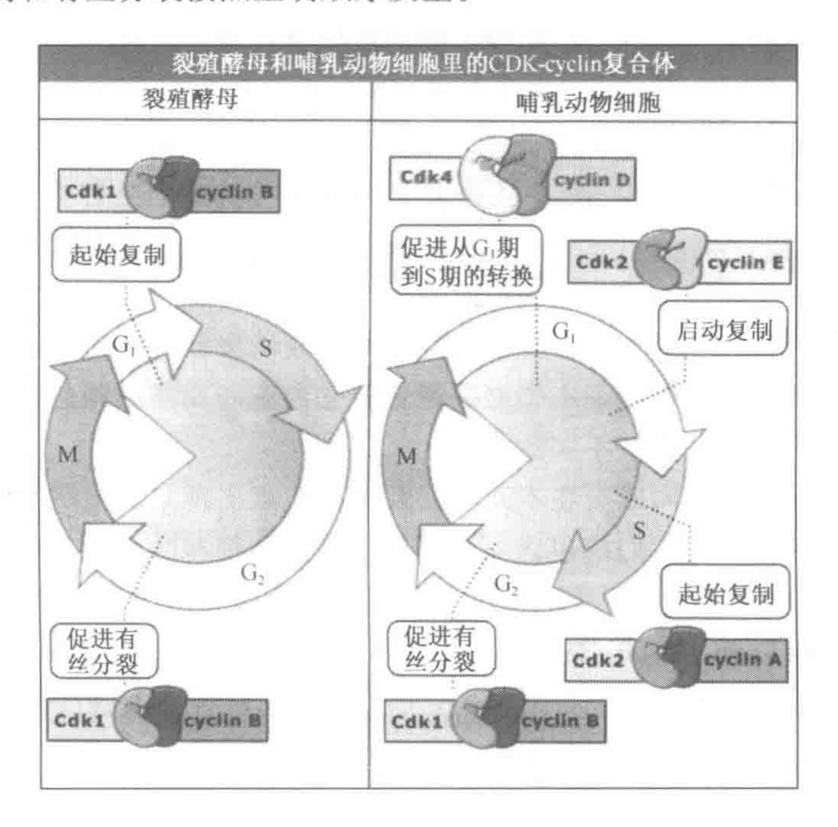


图 11.12　单一的 CDK-cyclin 复合体（Cdk1-cyclin B）能够促使裂殖酵母（左）中不同的细胞周期转换，而在哺乳动物细胞（右）中不同的 CDK-cyclin 复合体共同完成这些任务。

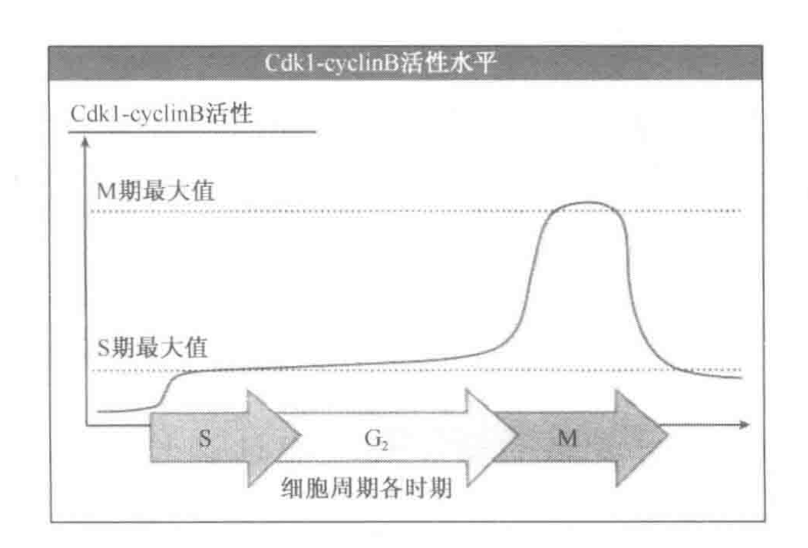


图 11.13　此图说明，单一的 Cdk1 活性的不同阈值刺激裂殖酵母细胞周期中的不同事件。

大多数生物中，每个细胞周期过程中有多种 cyclin 发挥作用，在不同的阶段伴随着不同 cyclin 的出现和消失。按照它们存在的细胞周期的阶段，可将它们分为三类：G_1 cyclin 负责使细胞周期从 G_1 期进入 S 期；S 期 cyclin 启动 DNA 的复制；M 期或有丝分

裂的 cyclin 则起始有丝分裂。许多细胞在每类中都有多个 cyclin；甚至像酵母这样简单的真核细胞就有 9 种 cyclin。这 9 种 cyclin 与相同的催化亚基相互作用。因为催化亚基在每个 CDK 复合体中都是相同的，而 cyclin 亚基不仅可以激活激酶亚基，还负责确定它要磷酸化的靶蛋白。

在多细胞动物中，不同类型的 cyclin 用字母来表示。Cyclin D 和 G_1 期相联系，cyclin A 和 E 与 S 期相联系，cyclin A 和 B 则与有丝分裂有关。

除了拥有多种类型的 cyclin，许多多细胞生物在每种类型中又有多种 cyclin（cyclin B1，B2 等）。这样产生了大量的 cyclin。如人类基因组，在细胞周期调控中至少编码 12 种 cyclin。为什么有这么多种？现在从许多生物中获得的证据是许多变异需要对 cyclin 有不同调节。例如，一些 cyclin 仅出现在细胞中的限制区域，如在核内或在**中心体**，反之，其他的则存在于动物的某些组织中而不是其他部位。Cyclin 也可能被暂时调控，即在同一时期存在的不同 cyclin 可能在不同时间出现或消失。这种精细调节的目的现在还不清楚，但是有种可能是根据细胞类型轻微地特化细胞周期是必须的。因此，细胞种类很多的大型动物可能需要许多不同的 cyclin。

虽然 cyclin 家族的不同成员在不同时间和不同地点出现，但是所有的 cyclin 在分子水平上拥有共同的特征。它们都包含一段家族所有成员都有的约 150 个氨基酸的相同序列，这段称为 cyclin box。这一序列是使 cyclin 结合到具催化作用的 CDK 亚基的分子区域。除 Cyclin box 以外，cyclin 的一级序列相当不同，尽管许多 cyclin 在参与底物识别的区域包含一个疏水修饰。虽然各不相同，cyclin 中好像有很大程度的功能冗余，它们中有些可相互替代，只是特异性并不总是很好。这种冗余最早在酵母中观察到，现在在鼠中也被发现。例如，鼠在 cyclin E 缺失时仍能正常发育和生存。很可能其他 cyclin 在 S 期起始上补偿了 cyclin E 的缺失，尽管它们通常可能并不与 cyclin E 执行相同的功能。

多细胞动物的细胞也包含若干种 cyclin 依赖激酶。尽管 CDK1 对有丝分裂是很重要的，但 CDK2、CDK4 和 CDK6 在细胞周期中更早地发挥作用。大多 CDK 与同一种或两种不同的 cyclin 相结合，每种 CDK 形成特异性复合体。结果，每个时期都有大量不同的 CDK-cyclin 复合体存在。CDK 亚基和 cyclin 的不同组合明显使它们在发挥作用的时间和地点上能精细地调控，无论是在单个的细胞中还是多细胞生物体的很多细胞中都是如此，同时也使它们有不同的作用底物。多种哺乳动物的 CDK-cyclin 作用阶段如图 11.12 右边部分所示。

总之，细胞周期转换受 CDK-cyclin 复合体调控。Cyclin 是在细胞周期中其丰度起伏变化的蛋白质，它们根据细胞周期的进程特异性地控制着 CDK 的活性。

11.5 CDK-cyclin 复合体受到多种方式的调控

关键概念

- CDK-cyclin 复合体受到磷酸化、抑制蛋白、蛋白质水解和亚细胞定位的调控。

虽然调节 CDK 的一个最基本的方法是 cyclin 的结合，但其他的机制也被用来调控它们的活性。本节将讨论调控 CDK-cyclin 复合体的各种途径，以及这些调控如何确定复合体的细胞周期特异性活性。

在很大程度上，当 CDK 结合 cyclin 后，调控机制就控制了它的活性。调控的另一个方面是使细胞周期的期间转换快速而且不可逆，以及对细胞内外条件作出应答终止或促进细胞周期。

一种控制 CDK-cyclin 复合体活性的方法是磷酸化。CDK 可以在两个不同的表面磷酸化，一个磷酸化可以激活激酶，而另一个则抑制激酶。活化磷酸化发生在激酶 T 环的一个苏氨酸残基上，这是一个在所有蛋白激酶中都很保守的结构域，并会引起 CDK 构象的改变，这种改变对其活化是必需的。这种正向磷酸化事件由一个活化 CDK 的激酶所催化。抑制磷酸化则在 CDK 的另一个区域发生，它或者是在一个保守的酪氨酸残基上，或者在一个邻近的苏氨酸残基上，如图 11.14 所示。

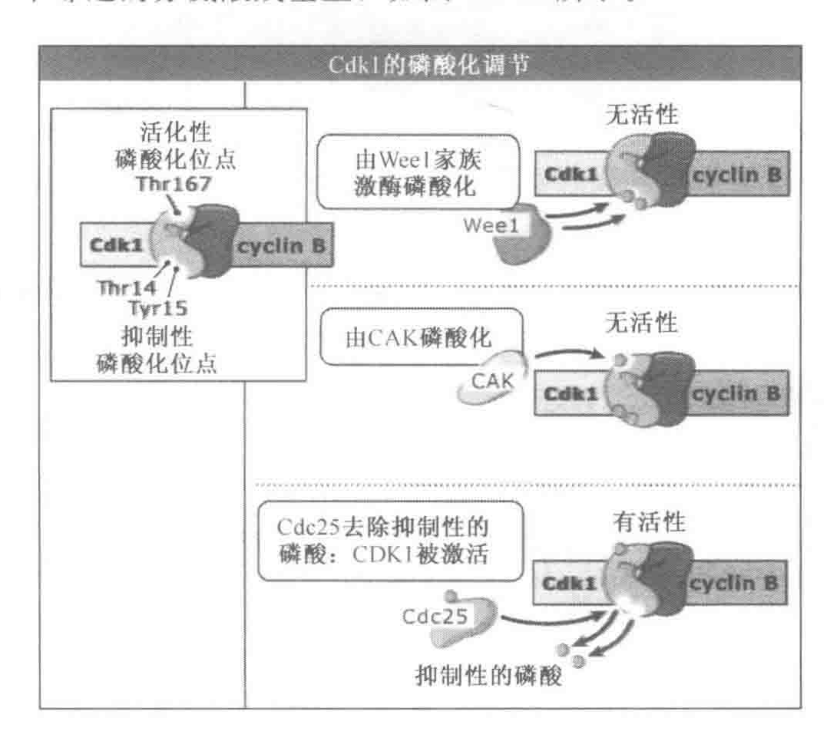


图 11.14 CAK 对 Cdk1 的 Thr167 磷酸化可活化复合体。尽管如此，Wee1 家族激酶对 Thr14 和 Tyr15 的磷酸化使 Cdk1 复合体在 G_2 期没有活性。在 G_2 期到 M 期的转换中，Wee1 的这一磷酸化可被 Cdc25 家族磷酸酶的活化逆转，从而产生有活性的 Cdk1 复合体。

抑制性磷酸化是由 Wee1 激酶家族成员催化的，通过 Cdc25 磷酸酶家族可去除此磷酸化。在任何时间，一种 CDK-cyclin 复合体的活性都受到这些位点磷酸化状态的控制，促进细胞周期进程的不同信号控制着 Wee1 和（或）Cdc25 的活性。例如，环境条件和检验点通过调控这些磷酸化事件中的一个或多个，都可以在细胞周期上发挥其作用。

CDK 调控的另一种形式包括一类小蛋白抑制因子的结合。这种 cyclin 激酶抑制因子（CKI）有两种类型。P16 抑制因子家族同激酶亚基相互作用，并阻止 cyclin 的结合。相反，CKI 的 Cip/Kip 家族成员，如 P27，可以结合并抑制 CDK-cyclin 复合体，如图 11.15 所示。目前鉴定出的大部分 CKI 都是在 G_1 和（或）S 期作用，它们在条件发生相应变化之前阻止细胞周期的进行。例如，P16 CKI 存在于 G_1 期，将细胞周期阻止在 G_1 期，直到足够的 G_1 期 cyclin 合成，并将 P16 CKI 从 G_1 期 CDK 中取代出来。

Cyclin 依赖性激酶也可以通过将它们与其活化因子、抑制因子和底物分离在细胞的不同部位加以调控。其中一个很好理解的例子是间期中 cyclin B1 定位的调控。细胞要

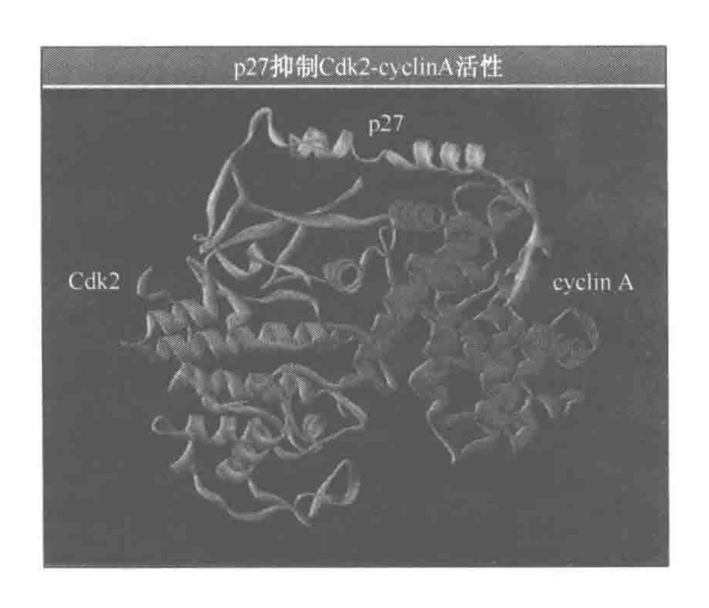


图 11.15　p27 抑制 CDK-cyclin 复合体。图像来自 Protein Data Bank file 1JSU。

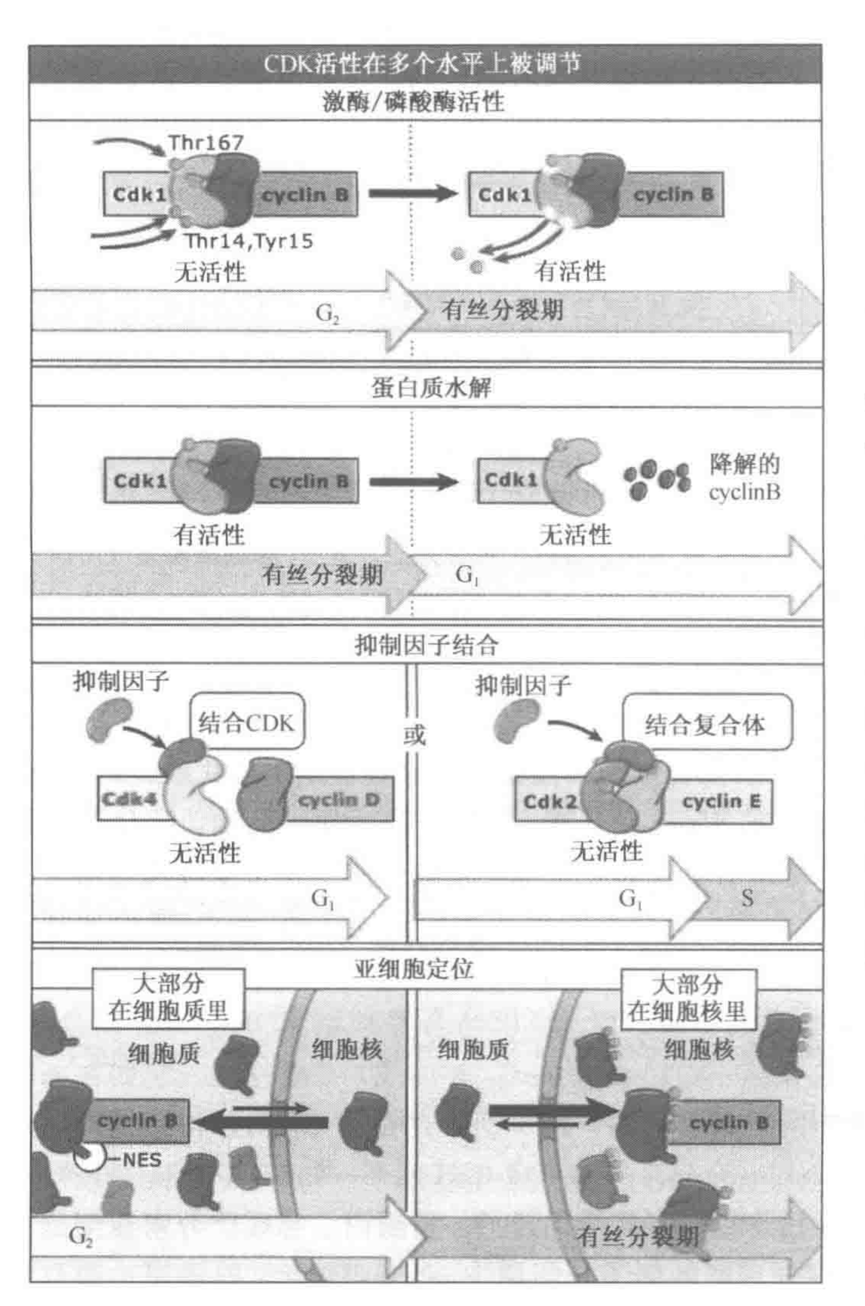


图 11.16　（第一行）CDK 活性受到活化磷酸化和抑制磷酸化的调控。（第二行）有丝分裂结束过程中 cyclin B 的蛋白水解促进了有丝分裂 Cdk1 的失活。（第三行）CDK 抑制因子（CKI）无论是与 CDK 亚基（左）还是与 CDK-cyclin 复合体（右）结合都会抑制 CDK 活性。（第四行）在 G_2 期，主要是 NES 介导 cyclin B 的核输出，这导致 cyclin B 与 Cdk1 的分离。在有丝分裂启动时，cyclin B 中关键残基的磷酸化会减弱它的输出，从而引起它在核中积累并与底物接近。

进入有丝分裂，cyclin B1 就必须与 Cdk1 结合，并磷酸化核中的底物。cyclin B1 不断地往返进出细胞核，因为它含有一个细胞质驻留信号和一个细胞核输出信号，间期它在细胞质中积累（核输出的细节见 5.14 细胞核中蛋白质的输出也是有受体介导）。就在有丝分裂开始之前，核输出信号因被磷酸化而失活，使成批的 Cdk1-cyclin B1 在核中积累，并与其底物相互作用。现已发现许多 CDK-cyclin 调控和 CDK 调节因子定位的例子。这种调控可能适合引起 CDK 复合体同其底物的接触。

如先前强调的，cyclin 的周期性作用是调节 CDK 亚基催化活性的一个关键机制。Cyclin 在细胞周期的确定时期积累从而激活它们的 CDK。在细胞周期转换点，cyclin 变得非常不稳定并被破坏，迫使细胞周期不可逆地进行。Cyclin 突然变得不稳定是由于以 cyclin 为靶标的泛素连接酶复合体的活化，随后由 cyclin 蛋白酶体将 cyclin 降解。泛素-蛋白酶体体系见BCHM：11-0001。简言之，**泛素（Ub）**与底物蛋白如 cyclin 共价连接，经过了一个由 Ub 活化（E1）、结合（E2）、连接（E3）酶组成的酶级联反应。一旦多泛素连接到一个蛋白质上，这个蛋白质就会被识别，并被一个称为蛋白酶体的蛋白复合体降解。在大量前馈控制的例子中，CDK 通过活化可导致其消除的 cyclin 泛素连接酶来规划其自身的破坏（具体例子见 11.7 细胞周期的进入受到严密的调控）。cyclin 类型不同，将其破坏的机制也不同。图 11.16 总结了用于调控 CDK 活性的不同机制。

本章后面部分，我们将明白细胞周期中心"机器"和一些控制方式如何相互作用来完成细胞周期的不同转换。许多相互作用是复杂的，我们将看到这种复杂性是必需的，它赋予细胞周期一些最功能性的特征：转换必须完整、不可逆，而且只有当细胞做好准备后才能发生。

11.6 细胞可以退出和重新进入细胞周期

关键概念

- 细胞可以维持在一个不分裂的状态，称为静止期，即 G_0 期。
- 静止期细胞受到环境刺激可以返回细胞周期。
- 细胞最初从 G_1 期重新进入细胞周期。
- 细胞也可以通过分化成为一种特化的细胞类型而永远离开细胞周期。
- 某些细胞通过凋亡按照程序自我消亡。

我们现在要介绍细胞周期进程必需的细胞周期核心机器。然而，这个机器并不总是开启，因为当外部条件不适宜时，细胞分裂是有害的。本节，我们将讨论细胞的环境信息如何整合并决定是否启动细胞周期"引擎"，开始细胞分裂。

当促使细胞分裂的信号受到限制时，多细胞动物的细胞会进入一个不分裂的状态，被称为**静止期**或 **G_0 期**。当细胞分裂所需的营养和信号具备时，许多细胞能够从 G_0 期重新进入细胞周期。这些信号包含相应的生长因子和激素。尽管如此，由于细胞在体内或体外的分化，它们会频繁地失去增殖能力，而且许多都进入了一个永久静止的状态，称为**衰老**。例如完全分化的神经细胞，即使给予它我们所知的生长促进剂，它也不再发生分裂。

一些细胞外因子可以刺激产生不同的细胞命运，如**凋亡**（凋亡的细节见第 12 章细

胞凋亡）。凋亡是多细胞生物发育的一个正常组成部分，它也能在培养中通过特殊的细胞外信号如肿瘤坏死因子-α（TNF-α）诱导，TNF-α 可以结合到特殊的受体上，然后经历一个将导致细胞死亡的生化途径。当细胞接受相互冲突的细胞外信号时，如在缺乏充足营养的条件下增殖，凋亡也可以发生。

酵母中，饥饿或交配因子的存在都可以抑制细胞增殖。酵母细胞通过降低可以使 ATP 转化为 cAMP 的腺苷酸环化酶的活性来响应饥饿条件（低氮和碳源）。cAMP 是一种细胞内第二信使，可以活化 cAMP 依赖的蛋白激酶，它可以刺激蛋白质的合成并促进细胞进入细胞分裂。当酵母细胞中的 cAMP 水平降下来时，它们将停留在 G_1 期。

交配因子是怎样抑制细胞周期进行的？单倍体芽殖酵母存在两种交配类型，MATa 和 MATα，两种类型分泌交配信息素并相互做出反应。例如，α 因子引起 MATa 细胞的 G_1 期停滞。α 因子结合到其 MATa 细胞表面的受体后会导致一个蛋白激酶信号的级联活化，继而产生两个反应：促进交配进行的交配应答基因表达和细胞周期的停滞。细胞周期停滞是由一种 CKI，Far1p 结合到 G_1 期 CDK-cyclin 复合体上介导的。

当刺激引起细胞从静止状态重新进入分裂周期时，细胞首先从 G_1 期开始。在到达 G_1 期一个特定的调控点之前，去除生长促进信号将阻止细胞周期的进一步进行，并使细胞返回到静止状态。尽管如此，细胞到达 G_1 晚期这个点后，将这些信号去除将不再影响细胞周期进行；无论细胞外相关信号怎样，细胞都会不可逆地进入细胞分裂。这是 G_1 期内起始（和完成）一个复制周期的点，在酵母中称为**起始点**，在多细胞真核细胞中称为**限制点**。细胞周期决定点（commitment point）的概念如图 11.17 所示。

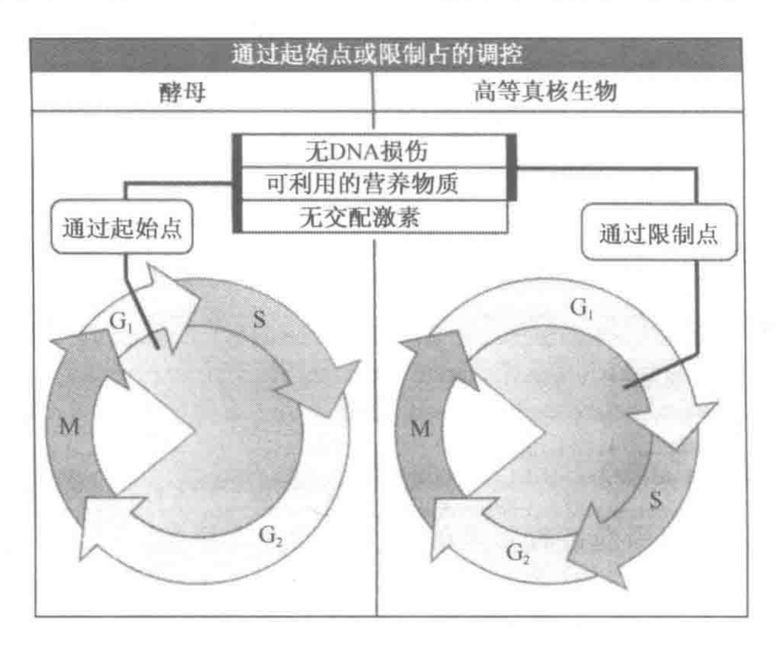


图 11.17　通过起始点（酵母中）或限制点（高等真核细胞中）将信号传递给细胞周期，并受到外部因素的调控，如可用于生长的营养或交配激素（酵母）。它也受到内在因素的调控，如 DNA 完整性。

当细胞离开静止状态后细胞控制机器是如何重新活化的？一种机制涉及解除 G_1 期 CDK-cyclin 复合体的抑制。首先，通过泛素介导对细胞周期停滞过程中积累的抑制性 CKI 进行降解。CKI 蛋白水解所需的保守的 E3 泛素连接酶被称为 **SCF**，与参与有丝分裂的 cyclin 泛素化的 E3 泛素连接酶是有区别的。

SCF由四种核心亚基组成：Skp1、Cdc53、一个F框蛋白和一个锌指蛋白Rbx1。多个F框蛋白存在于每种类型的细胞中，它们可以与不同的底物结合，从而使SCF复合体具有底物特异性。锌指蛋白则与E2酶相互作用。

底物先磷酸化是其被F框蛋白和SCF识别的一个先决条件。就CKI来说，由CDK-cyclin催化的多位点磷酸化会导致SCF对它的识别和随后产生的蛋白质水解。随着CKI的降解，G_1期CDK随之活化。少量CDK-cyclin活性扩增，最终CDK活性达到使细胞通过细胞周期一个阶段的水平。因此，SCF复合体起到了CKI的负调控因子的作用，又起到了返回细胞周期的正调控因子的作用。一个SCF复合体的大概组成和它对CKI的活性如图11.18所示。泛素介导的降解的细节见BCHM：11-0002。

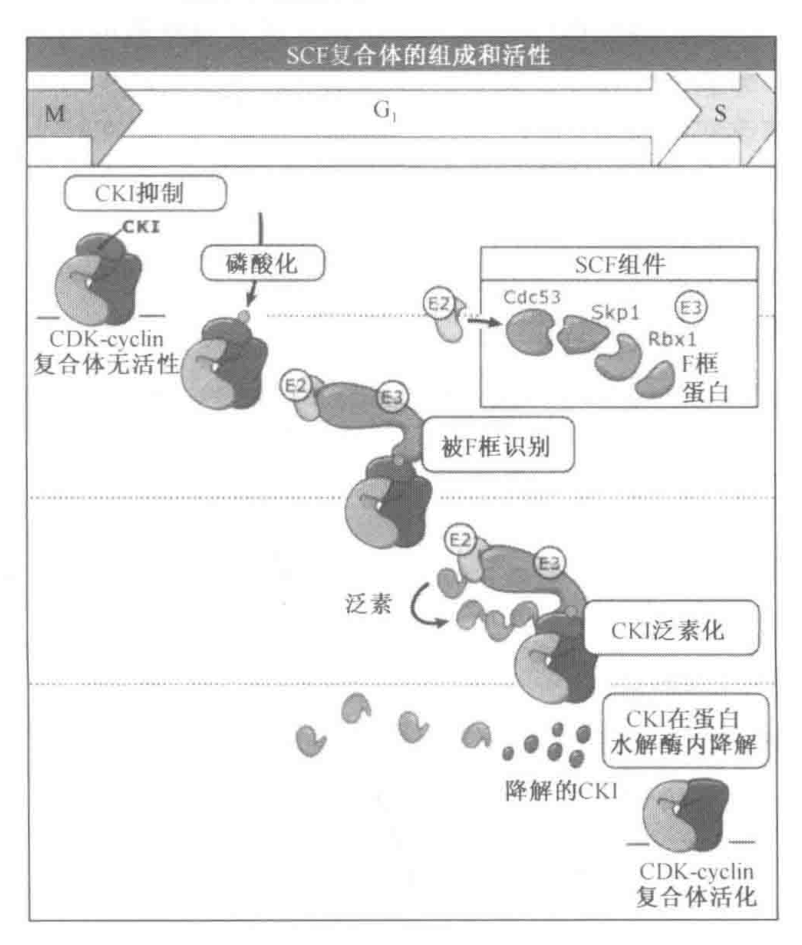


图11.18 一个SCF复合体由四个中心亚基组成：Rbx1（指环蛋白）、cullin蛋白（例如Cdc53）、Skp1和F框蛋白。F框蛋白亚基可以识别特异的磷酸化底物，并通过F框结构域结合Skp1，使它们连接到SCF复合体上。

总之，细胞外环境通常控制细胞是否分裂。当条件不利于分裂时，细胞会进入一个静止状态。当有利条件出现时，细胞会从G_1期起重新进入周期。重新进入细胞周期并通过G_1期，这都需要G_1期CDK的活化，而活化则需通过合成G_1期cyclin，并使抑制CDK-cyclin复合体的CKI失活来共同完成。

11.7 细胞周期的进入受到严密的调控

关键概念

- 细胞分裂并不是连续的，而是受到外部刺激和可利用营养的控制。
- 细胞检测其环境中存在的化学信号。
- 细胞外部信号可以引起一个细胞内的生化反应，或者使细胞进入细胞周期，或者使细胞周期停留在G_1/G_0期。

正常的细胞增殖仅在条件适宜时发生。对单细胞生物，足够可利用的营养为增殖创造了一个适宜的环境。在多细胞生物中，是否增殖还需要其他的环境信号。实际上，这些外部信号可能是刺激性的也可能是抑制性的。这些信号是如何被理解并进入到细胞周期机器中的？

刺激增殖的肽和激素称为**生长因子**。这些因子存在于血清中，这就是为什么血清被用于体外培养细胞的原因。最早从血清中鉴定出的肽类生长因子是血小板来源的生长因子（PDGF）。PDGF由血清凝固中的血小板释放，它促进伤口愈合所需的细胞快速增殖。PDGF和其他的生长因子会结合在靶细胞表面的特定受体上。这些受体与引起细胞增殖的细胞内信号途径相关联。

生长因子如何将起始S期和有丝分裂所需的CDK激活？随着生长因子的结合和受体的激活，许多生化事件开始进行，细胞内产生第二信使。最终，这些将导致基因表达的改变，如图11.19所示。添加血清后，一组表达十分迅速的基因被命名为早期应答基因。它们中有许多都编码如Fos、Jun和Myc之类的转录因子，它们可以活化被称为延迟的早期应答基因。一种延迟的早期应答基因是G_1期cyclin，即cyclin D。虽然CDK应答生长因子的活化还需要其他因素，但刺激cyclin D的表达是驱使细胞通过G_1/S转换的一种重要机制。

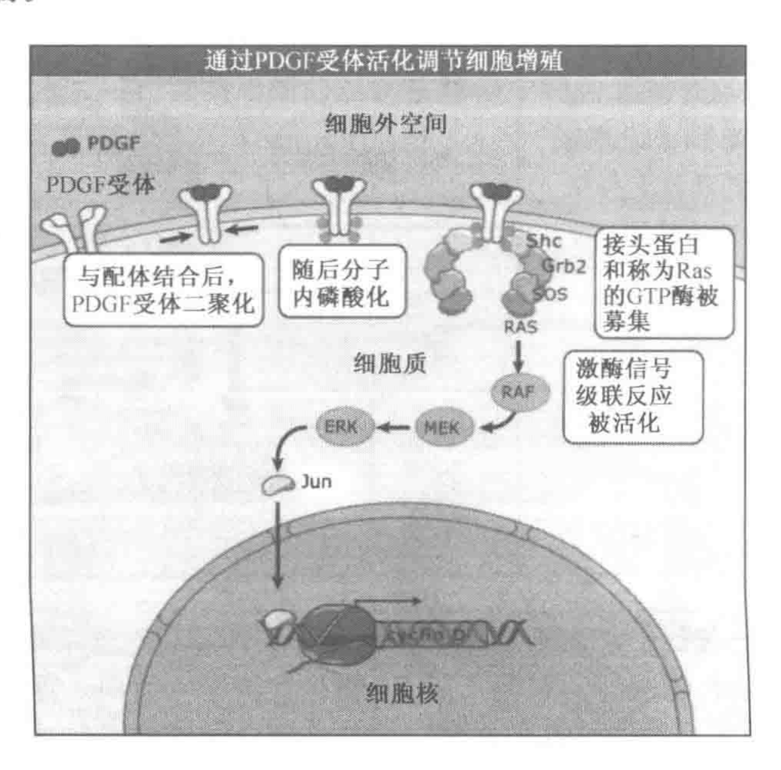


图11.19　配体与受体胞外表面的结合可导致这个受体的二聚化和活化。在这个例子中，一个酪氨酸型激酶受体，PDGF受体，通过分子内的磷酸化，募集称为Shc、Grb2和SOS的接头蛋白。这样募集并活化了一种称为RAS的GTP酶。这些蛋白质活化了一个激酶信号级联反应，其成员包含RAF、MEK和ERK激酶，最终将导致转录应答。在这一应答中，调控细胞增殖和使细胞通过限制点的基因被诱导表达，由此启动细胞分裂周期。

CDK和与之结合的G_1期cyclin磷酸化肿瘤抑制因子Rb使细胞通过限制点，Rb可结合并抑制转录因子E2F。G_1期CDK-cyclin复合体（最初是cyclinD与CDK4或CDK6结合）对Rb的磷酸化将导致它与E2F的分离。不受抑制的E2F就可以刺激其自

身的表达和其他基因的表达。这些基因包括 cyclin E、起始复制所需的蛋白质和随后在细胞周期中起作用的蛋白质。

Cdk2-cyclin E 也可磷酸化 Rb，加速 E2F 从 Rb 中释放出来。因此，少量 CDK 的活性可带来 G_1 CDK-cyclin 复合体的量和活性的增加。CDK-cyclin 复合体对 Rb 和 E2F 的调节如图 11.20 所示。Rb 功能的缺失在肿瘤发展中发挥着很重要的作用（见第 13 章癌症——原理与概述）。

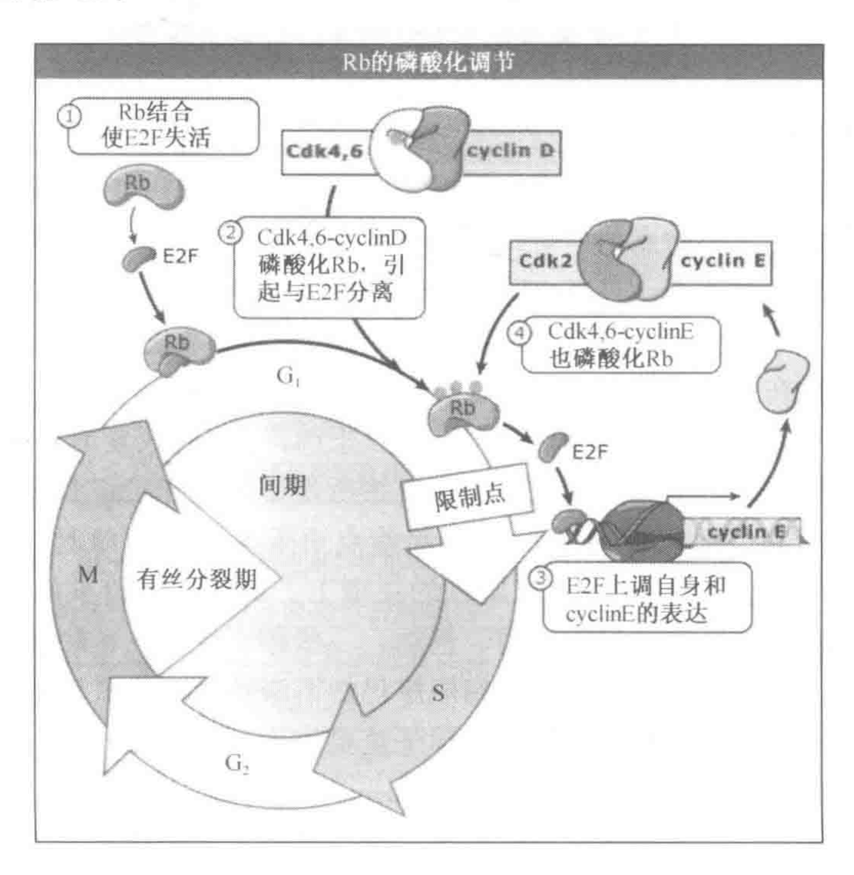


图 11.20　Rb 的结合使转录因子 E2F 失活。当 Rb 被磷酸化时，它不能同 E2F 结合，因此，使得 E2F 上调许多基因的表达，包括它自身和 cyclin E。随后 Cdk2-cyclin E 可以磷酸化更多的 Rb，从而形成一个扩增环。当积累了足够的 Cdk2-cyclin E 时，细胞通过限制点。

因此，cyclin 依赖性激酶的通常模式在细胞周期的不同阶段重复出现。然而，正如我们将看到的，复制过程中这种细胞周期依赖性与染色体上每个 DNA 复制起始的顺式调节相耦联。

11.8　DNA 复制需要蛋白复合体的顺序组装

关键概念

- 细胞进程通过限制点或起始点后，就会进入复制阶段。
- 复制的调控是逐步完成的，并与有丝分裂的完成相协调。
- 复制从起始点开始，起始点有明确的序列、位置或间距。
- 复制只会起始于复制起始点。
- 复制一旦进行，起始点在下次细胞周期前不能再次使用。

细胞一旦检测到适宜的环境因素并决定进入分裂周期时，它们将通过 G_1/S 期的转

换开始 DNA 复制。细胞如何装配并激活 DNA 复制所需的因子？什么机制保证了细胞每个分裂周期的复制且仅复制一次其自身的 DNA？

虽然对这些问题的完整答案仍然是未知的，但通过酵母染色体独立复制的 DNA 序列的鉴定和分析获得了大量 DNA 复制过程的信息。这些序列叫做自主复制序列（ARS)，它是染色体复制起始点的一部分。复制起始点是使复制开始的一段 DNA 序列。芽殖酵母的起始点是由小的共有序列确定的，而大多数其他物种的起始点则不同。裂殖酵母中，起始点是富含 A/T 碱基的大段 DNA，而不是特殊序列。在其他真核细胞中，起始点是由非序列特异的 DNA 结合蛋白在基因组中的分布机制来随意确定的（ARS 的发现见MBIO：11-0001)。

一条染色体必须有足够的起始点来保证基因组的及时复制。在细菌中，一个简单的环状染色体只需要一个起始点，但是在具有分散在多条线性染色体上的庞大基因组的真核细胞中必须有多个起始点。具有 13Mb 基因组的芽殖酵母中，约有 400 个起始点分布在 16 条染色体上。它会带来一些调控问题。复制起始点的作用也必须同细胞周期相协调，所以起始点只在 S 期使用。细胞需要确定在进入有丝分裂前复制已经完成。另外，在每个细胞周期中，每个起始点只能使用一次，来确保 DNA 仅复制一次。

复制起始点确定复制活化和 DNA 合成起始所需因子的结合。DNA 复制的起始只在结合必需的因子，而且可以复制的那些起始点上发生。尽管如此，在每次复制中，DNA 复制限制在染色体上一个潜在起始点的亚型上。而且，起始事件是暂时分别进行的，因为不同的起始点活化的时间不同。例如，一些起始点早在 S 期就被活化了，而其他的则较晚活化。是什么决定了这个时间顺序仍然不清楚，但是像是染色体上的一个特殊起始点的部位在确定复制时间上似乎发挥了重要作用。

为了 DNA 复制的起始，预复制复合体（pre-RC）必须在起始点进行装配。通过对非洲蟾蜍卵提取物进行的生化研究，补充了对酵母的遗传学研究，并形成了 pre-RC 的装配图。它起始于一个六蛋白复合体，即起点识别复合体（ORC）与 DNA 的结合。ORC 标记了潜在的起始点，但不足以引起活化。它为另外两个保守蛋白：属于 AAA＋ATP 酶家族的 Cdc6 与 Cdt1 的结合提供了一个平台（许多具有 ATP 酶结构域的蛋白质利用 ATP 水解释放的能量来完成功能）。然后招募微小染色体支撑复合体（MCM），这是一个由六个紧密相关的同样也是 AAA＋ATP 酶家族成员的蛋白组成的环。MCM 量很大，而且 MCM 复合体可以跨过起始点。一旦 MCM 装载完毕，ORC 和 Cdc6 就不再是必需的了，pre-RC 维持着活性。pre-RC 在起始点的有序装配如图 11.21 所示。

pre-RC 的装配通过一些机制限制在 M 期结束与早 S 期之间。首先，Cdc6 蛋白的量受到控制使它只有在这个期间内可被利用。在 Cdc6 缺乏时，MCM 蛋白就不能结合到复制起始点上。其次，在多细胞动物的细胞中，Cdt1 蛋白被一种称为孪蛋白的可以在 G_1 期外阻止自身活化的蛋白负调控。最后，pre-RC 的装配还受到有丝分裂 CDK-cyclin 活化的限制。CDK-cyclin 复合体以 ORC、Cdc6 和 MCM 为靶标。作为对 CDK 磷酸化的应答，Cdc6 失活，而且 MCM 在 S 期被 CDK 磷酸化与它从 DNA 上脱离相关。因此，只有当 CDK-cyclin 活性较低时 pre-RC 才能形成，这一时期处于有丝分裂 CDK-cyclin 活性高的 M 期和活性再次升高开始使用起始点的 S 期之间。

起始点如何从一个预复制状态转变到一个复制状态？这个转变需要许多其他蛋白质

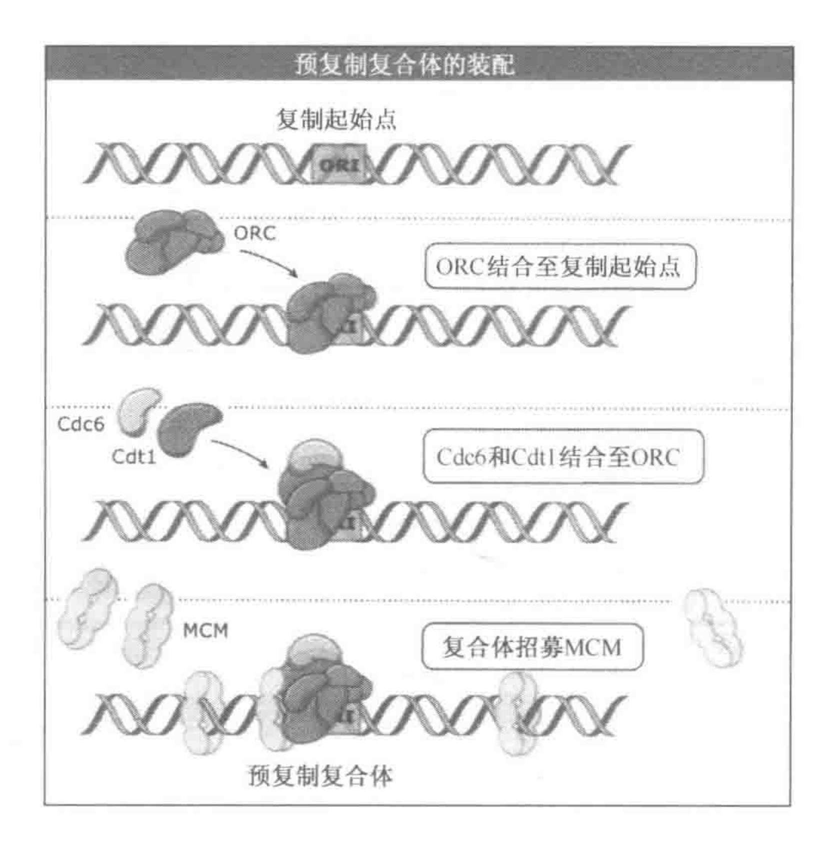


图 11.21　在细胞周期中，ORC 与染色体上的复制起始点结合。有丝分裂晚期到 G_1 期这样一段细胞周期短暂的时间内，蛋白 Cdc6 和 Cdt1 也与起始点相结合。由此又募集 MCM 六聚解旋酶复合体（MCM2-7）。这样就完成启动前的过程和 pre-RC 的装配。

的组装，并受到 CDK-cyclin 和 Cdc7-Dbf（DDK）两种激酶调控。因此，CDK-cyclin 活性对复制与细胞周期进程的耦联既有负调（阻止 pre-RC 的装配，以及不适合起始点的再利用），又有正调（促进起始点的活化）。

如果 CDK-cyclin 活性主导整个细胞周期耦联，那么 DDK 在单个起始点起始了 DNA 的合成。目前已知的最突出的底物是 MCM 蛋白。有趣的是，Mcm5 的一个单点突变可以绕过对 DDK 的需要，这表明 DDK 的磷酸化导致 MCM 结构的改变从而使起始进行。尽管如此，结构上的证据表明变化是很微小的。CDK 和 DDK 的活性对复制的控制如图 11.22 所示。

在个别起始点上的限速步骤可能是 Cdc45 蛋白的结合，这种蛋白需要 CDK-cyclin 和的活化。Cdc45 的结合伴随另一个称为 GISN 复合体的装配，通过活化作为解旋酶的 MCM 复合体，导致起始点 DNA 的解链。因此，MCM 从一个 pre-RC 装配因子转变成一个解旋酶，将成为延伸复合体的组成部分。在起始点的解链显露出被 ssDNA 结合蛋白 RPA 束缚的单链 DNA，接着是引物酶/DNA 聚合酶 α 复合体的装配，DNA 的合成开始。MCM 复合体和 Cdc45 的移动伴随着复制叉的展开，这样形成了一个包含 DNA 聚合酶 δ 而不是聚合酶 α 的大**复制体**。DNA 复制的起始如图 11.23 所示。细胞依靠检验点和修复机制来维持复制体和保护复制叉 DNA。

一旦 MCM 从复制起始点上移开，起始点就是“已使用的”，在紧邻的 M 期结束之前，起始点都不会被重新活化，这时 pre-RC 再次在起始点形成。在 S 期进行时，MCM

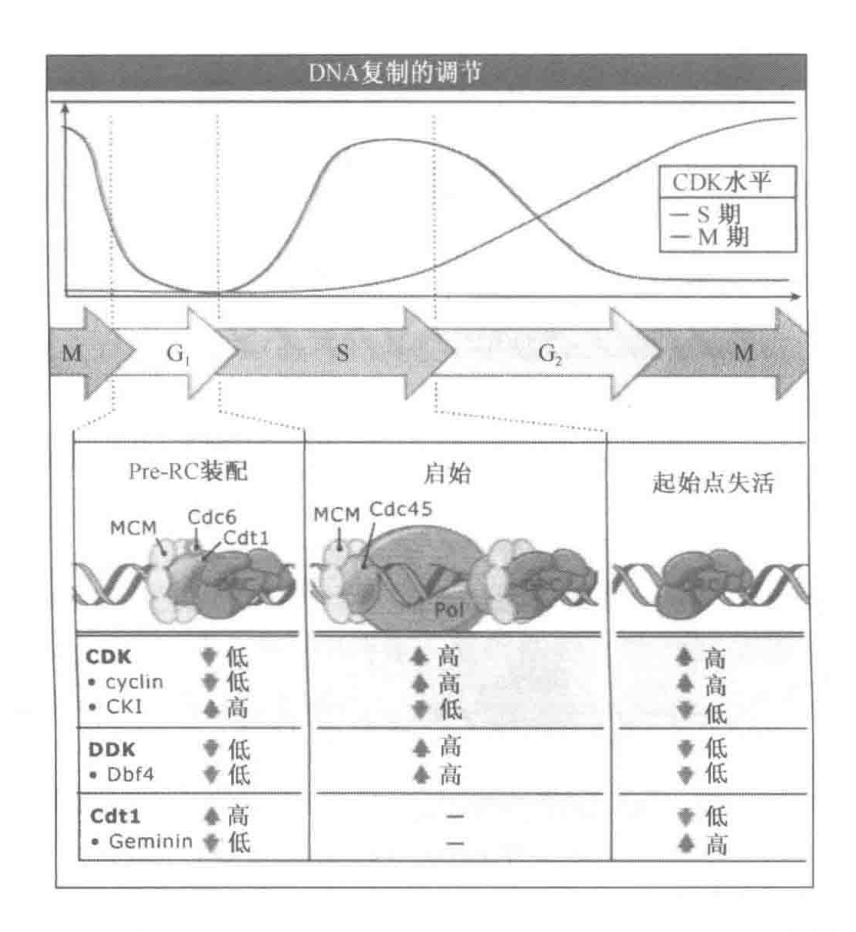


图 11.22　pre-RC 在晚 M 期和 G_1 期装配，此时 CDK 和 DDK 活性较低。随着 CDK 和 DDK 活性上升，DNA 合成开始。pre-RC 随着 DNA 合成的起始而分解，由此使起始点失活，且只有当有丝分裂结束后 CDK 活性再次下降时才能重新装配。

从染色质上脱离。另外，移动的复制叉与有丝分裂前新合成的姐妹染色单体连结的 cohesin 蛋白合成相关。因此，S 期的完成与有丝分裂中染色体正确分离所需结构的形成相关，细胞周期不同时期间有着密切的联系。

起始点功能也受到染色体构成的调节。有必要记住，细胞中的 DNA 是通过核小体包装成染色质的，其结构是受到约束的。这会影响起始点的时间选择：例如，并不是所有起始点都在 S 期的同一时间复制。在某些情况下，起始点开始复制的相对时间似乎由起始点在染色体上的位置决定，而不是由起始点本身。位于具转录活性常染色质的起始点开始得较早，而那些接近转录惰性异染色质的起始点一般在 S 晚期开始复制。例如，染色体端粒附近区域的起始点（一般为转录惰性）在 S 晚期复制。这个普遍规律已通过芽殖酵母完成的精细实验得到证实，这个实验是将复制较晚的起始点转移到常染色质区域，复制就会提前进行，反之亦然。尽管如此，起始点时间选择也受到一些内在因素影响，染色质结构和核中定位在复制动力学上的作用仍不完全清楚。

因此，基因组复制需要各种信号的综合，包括监控细胞状况的整个细胞周期调节因子，以及调节单个顺式作用位点的染色质特异性结合蛋白。CDK 和 DDK 活性的协调显示出不同类型的激酶怎样为细胞周期进程提供一个综合信号。

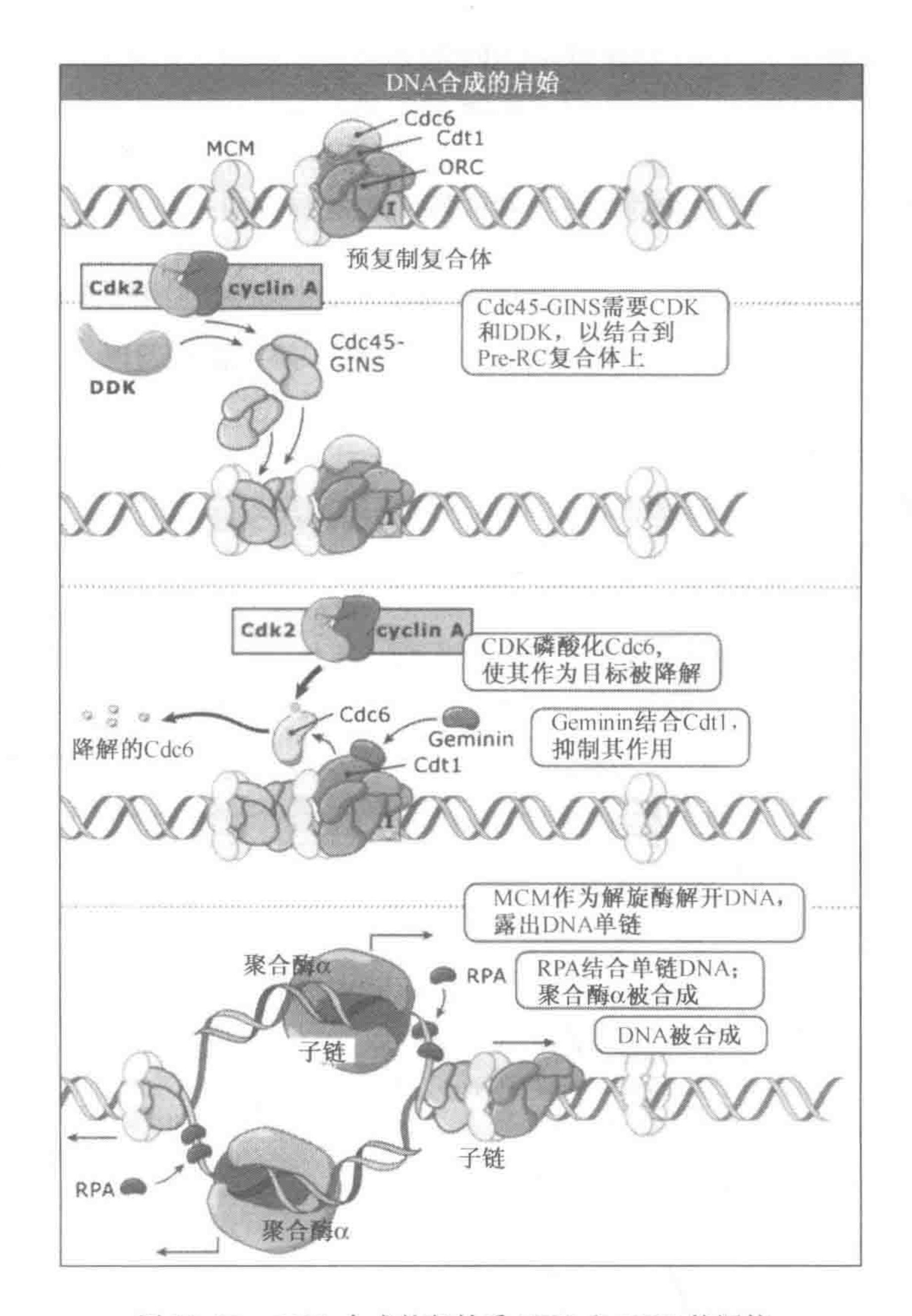


图 11.23　DNA 合成的起始受 CDK 和 DDK 的调控。

11.9　有丝分裂由几种蛋白激酶协同完成

关键概念

- 在许多真核生物细胞中，从 G_2 期到 M 期的转换是一个主要的控制点。
- 一些蛋白激酶的活化与 G_2-M 转换相关。

细胞周期的 G_2 期与有丝分裂的准备相关。大部分细胞在这个时期生长，因此核质比在细胞分裂前保持不变。此外，DNA 复制中的错误在细胞进入有丝分裂和开始进行染色体分离前就需要检测到并在 G_2 期加以纠正。当所有条件都满足时，细胞如何起始有丝分裂？本节我们将讨论促进有丝分裂进程的蛋白激酶。

Cdk1-cyclin B 是促进 G_2-M 期转换的主要有丝分裂激酶。当有丝分裂 cyclin 聚集、结合 Cdk1 及复合体聚集时，它仍然由于 Wee1 家族激酶介导的抑制磷酸化作用而处于

失活状态。当细胞缺乏 Wee1 活性时，Cdk1 就不会受到抑制，结果细胞进入有丝分裂，使细胞体积减小。Mik1 是一种 Wee1 的同系物，对 S 期延长时磷酸化和抑制 Cdk1 有重要作用。一个哺乳动物的 Wee1 同系物 Myt1，特异性定位在内质网上，而这个家族其他成员则定位在核上。这些激酶磷酸化酪氨酸残基（Tyr15）或对其邻近的苏氨酸残基（Thr14）起到抑制作用。

Cdk1 活化和有丝分裂进入的限速步骤是 Cdc25 磷酸酶对抑制性磷酸化（Tyr15，Thr14）的去除。与 Wee1 不同，裂殖酵母中的 *Cdc25* 基因是必需的。如果抑制性磷酸化没有去除，有丝分裂就不能发生。在哺乳动物中有三种不同的 Cdc25 异构体来确保这个关键事件的调节。

对于 Cdk1 的活化步骤，Cdc25 的调节研究得最清楚。在高等真核生物中 Cdc25 活化包括 polo 样激酶（PLK），它是不同于 CDK 家族的一个保守激酶家族。在 Cdc25 的 PLK 活化和随之 Cdk1 活性增加后，Cdc25 的进一步活化可能由 Cdc25 本身介导。这一 Cdk1 活化的正反馈结果使其激酶活性迅速升高，并使细胞进入有丝分裂。Wee1 的活性由 Cdk1 磷酸化负调节，确保为有丝分裂的进入而迅速活化 Cdk1。Cdk1 活化步骤如图 11.24 所示。

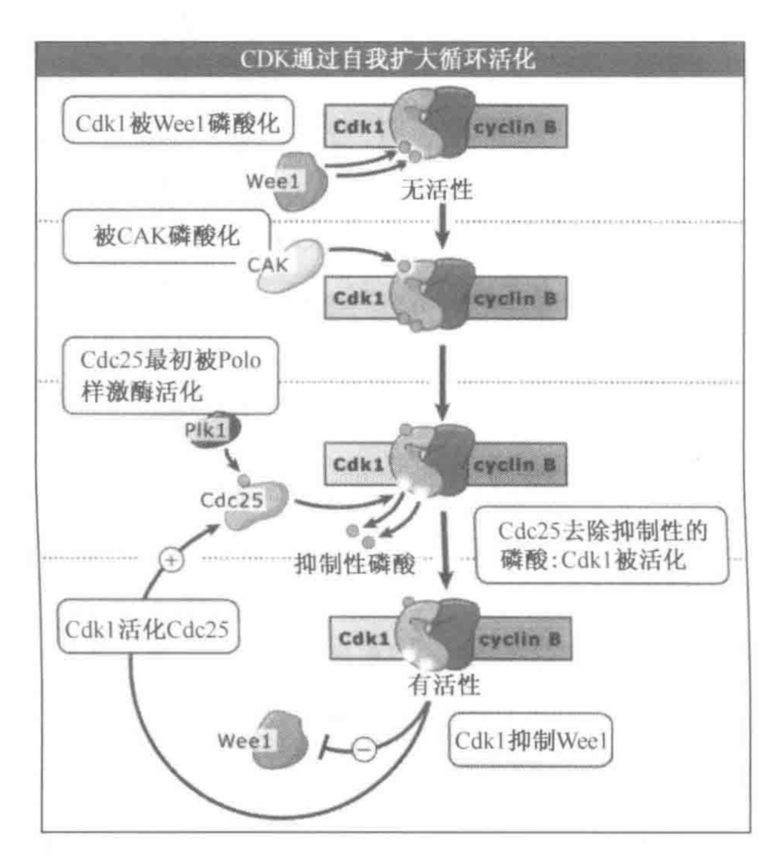


图 11.24　Cdk1 的磷酸化可启动其活性，但是也使它处于失活状态。Polo 样激酶（PLK）可以活化 Cdc25 磷酸酶，Cdc25 随后通过除去 Cdk1 上抑制作用的磷酸来活化少量 Cdk1。Cdk1 一旦被活化，就会磷酸化 Cdc25 并增大它的活性。此外，一些 Cdk1 被活化后，它可以磷酸化 Wee1 并使之失活。这种自我扩大循环导致 Cdk1 的急剧活化。

两种不同的 CDK-cyclin 复合体控制着多细胞生物细胞中有丝分裂的进入和进程。例如哺乳动物细胞中，Cdk1-cyclin A 调节有丝分裂的某些方面，包括染色体浓缩和在

有丝分裂纺锤体上的排列，几种具有不同定位和细胞周期性的 cyclin B 通过磷酸化不同的底物来调节其他有丝分裂事件。近些年，许多 Cdk1 底物被发现，某些已被证明是有丝分裂中影响 Cdk1 功能真正的候选分子。

不仅 Cdk1 被认为是主要的有丝分裂调节因子，其他蛋白激酶家族也在有丝分裂的各个方面起到关键作用，这里我们将介绍它们中的三个。首先，是前面提到的 PLK，它属于这样的家族。PLK 首先在有丝分裂某些方面失去功能的果蝇突变体中被鉴定出来，随后在许多真核细胞中发现了 PLK，在这些真核细胞中，它参与有丝分裂起始、中心体成熟、纺锤体形成、染色体分离和胞质分裂。然而果蝇和酵母的基因组编码了单一的 PLK 酶，脊椎动物通过 Plk1 产生了多达四种不同的家族成员，与果蝇和酵母中的 PLK 具有非常相似的功能。这个家族的所有成员都包含一个 N 端激酶结构域和由一个或更多称为 Polo 框的保守基序组成的 C 端结构域。PLK 结构域构建和活化方式如图 11.25 所示。

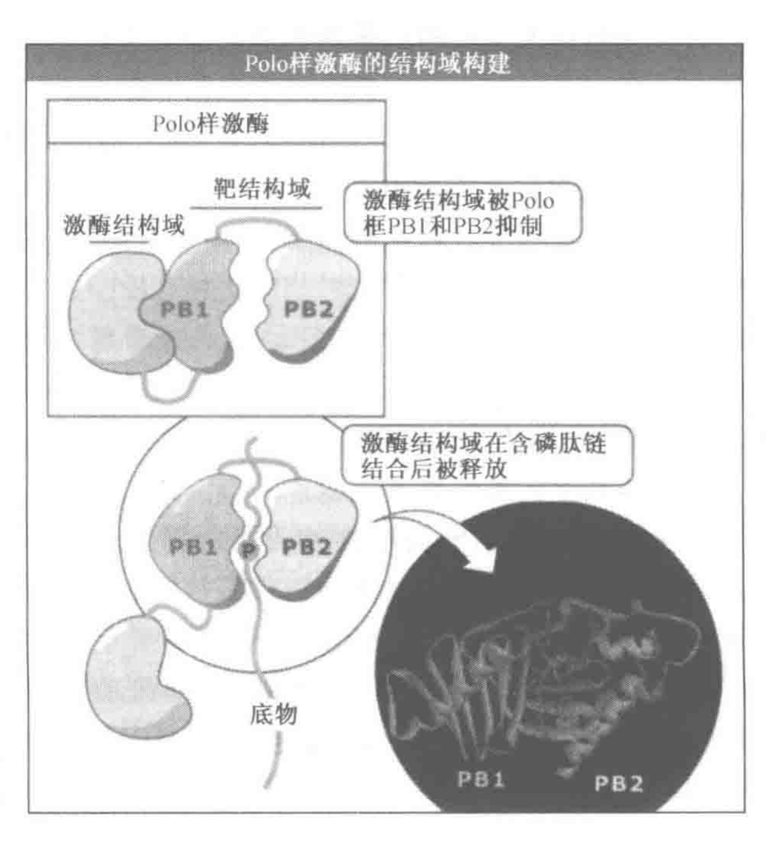


图 11.25　Polo 家族激酶拥有一个 N 端激酶结构域和一个包含两个称为 polo 框（PB1 和 PB2）的保守区域的 C 端区域。Polo 框使激酶定向与胞内的相关蛋白结合。图像来自 Protein Data Bank file 1UMW。

Polo 框是 PLK 的细胞内靶结构域，并负责引导它们到达中心体、**着丝粒**（连接染色体和微管末端的蛋白质结构）、有丝分裂纺锤体和胞质动力环上的多个定位点。Polo 框与磷酸丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸模块相结合，这是 Cdk1 和其他脯氨酸引导的激酶共有磷酸化序列，如 MAP 激酶。可能在体内对 PLK 的停靠位点包含其结合者范围内的额外的信息，这个发现显示 PLK 停靠在已被 Cdk1 或其他激酶磷酸化的蛋白质上。这个机制将为不同的有丝分裂激酶活性提供复合点，也为其他蛋白激酶对 Plk1 的辅调提供了方法。这个机制也已经解释为什么 PLK 在有丝分裂过程中被平行或下游的 Cdk1 或

其他激酶活化。PLK 可能在它们的多个活性位点上有许多底物。目前这些细节上的研究都与纺锤体形成和胞质分裂的确定作用相一致。

在构巢曲菌中发现了在有丝分裂中起作用的第二个激酶家族，NimA-like 激酶(NEK)。为什么说利用多种生物来研究细胞周期控制是那么的重要，这是最早的一个例子，每种生物都为获得广泛的信息做出了独特的贡献。在构巢曲菌中，即使 Cdk1 活性很高，*nimA* 突变体仍停滞在 G_2 期，这表明 Cdk1 活性并不足以启动所有的有丝分裂事件。实际上，有丝分裂中 NIMA 的蛋白激酶活性与 Cdk1 的活性相平行。基于序列同源性，现在许多真核细胞中已经鉴定出 NEK，并发现它参与若干包括染色体浓缩和中心体分离的有丝分裂事件。

第三个因其参与有丝分裂事件而受到关注的激酶家族是 Aurora 家族。同 Cdk1 和 PLK 相似，Aurora 激酶参与许多事件，包括染色体浓缩和分离、动粒功能、中心体成熟、纺锤体形成和胞质分裂。Aurora 激酶首先在芽殖酵母中被鉴定出来，芽殖酵母中它只有一个成员，它们也在包括人类在内的多细胞真核生物中得到鉴定，它们属于下面三个类型中的一种：Aurora A、B 或 C。

所有的 Aurora 酶都有一个共同构造，即在激酶结构域之前具有长度可变的 N 端结构域，紧接着是一个短的 C 端尾。在有丝分裂中 Aurora A 水平较早达到最高点，由于以 cyclin 相似的方式进行泛素介导的蛋白水解作用，Aurora A 水平于后期开始时下降。Aurora A 活性也受到其 T 环上磷酸化的调节。正如在 Cdk1 中，这种磷酸化事件对 Aurora A 活性是必需的，而且它也受到一组其特征不完全清楚的蛋白质的控制。蛋白磷酸酶 1（PP1）活性参与平衡 Aurora A 激酶活性，可能还包括 Aurora B 激酶活性。

虽然十分清楚 Aurora 激酶对有丝分裂的多个步骤都很关键，但关于这些激酶如何被调节以及它们活化的详细机制，还有许多问题仍需继续研究。目前仍然不知道 Aurora 活性如何与其他有丝分裂中的蛋白激酶活性相关联。例如，不知道它们是平行发挥作用，还是成系列地发挥作用，或者同其他激酶协作来控制有丝分裂事件。

一个重要的发现是认识到 Aurora 激酶的失调可能导致肿瘤发生。许多类型的肿瘤出现 Aurora 激酶水平提高和 Aurora A 过表达能够转化啮齿动物细胞。虽然机制并不清楚，但 Aurora 激酶的过表达可能导致中心体复制和染色体分离的缺陷。另外，Aurora A 被认为是一个癌症易感性基因（见第 13 章癌症——原理与概述）。

总之，有丝分裂的起始和进行需要 CDK、Plk、NEK 和 Aurora 激酶家族的功能。因为控制这些活性对维持基因组的完整十分关键，每种激酶都受到严格的控制以阻止过早活化，并保证其及时失活。有较多的证据表明 Plk 对其他激酶活性的依赖性，尤其是 CDK。

11.10 有丝分裂中发生许多形态学上的变化

关键概念

- 细胞核和细胞骨架的构造在有丝分裂时发生很大的变化。
- 有丝分裂激酶对有丝分裂事件的正确完成是必需的，这些事件主要包括核被膜解体、染色体浓缩和分离、纺锤体装配及胞质分裂等。

我们已经讨论了对于有丝分裂的起始和进行所必需的四个蛋白激酶家族。这些激酶在有丝分裂进程中的精确功能是什么？这是当前的研究仍试图解答的问题，因为细胞进入有丝分裂伴随着许多形态学和生化上的变化，而这些激酶对所有这些方面都是必需的。本节我们描述这些激酶控制的有丝分裂主要事件，提供一些它们在特定过程中详细作用的众所周知的例子，也讨论它们活性的普遍特征。

在高等真核生物细胞中，有丝分裂中一个最明显的变化是细胞核与细胞质间屏障的瓦解。核被膜解体，支撑细胞核结构的核纤层也同时解聚。

细胞进入有丝分裂，其细胞骨架构造将发生明显的变化。其中一个大的变化是有丝分裂纺锤体的形成。微管是α-和β-微管蛋白形成的二聚体，它存在于整个细胞周期中。在间期，中心体（酵母中的类似物是纺锤极体）组织微管在细胞质中形成长的纤维丝。在有丝分裂中，这些细胞质中的纤维丝解聚，中心体（在细胞周期较早时就已经复制）分离，并且在它们之间形成一个两极的微管纺锤体。

染色体开始连接到纺锤体内的微管末端，然后连接到中心体上。在染色体上的连接位点称为动粒。因为每个姐妹染色单体都有它自己的动粒，它们与来自两极中心体的微管相连接，在有丝分裂中姐妹染色单体均匀地分离。

有丝分裂过程中从每个中心体发出的微管形成星体，并与细胞皮层相互作用。这些微管有利于中心体的定位，随后确定细胞内有丝分裂纺锤体的方向。在大多数类型的细胞中，细胞分裂的方向是由有丝分裂纺锤体的位置确定的，通过移动纺锤体使其偏离中心可以改变细胞分裂的方向。这发生在多细胞生物发育的某一特定阶段，使子细胞中的胞内各种成分不相等，其发育命运将各不相同。

有丝分裂中形成的另外两种重要结构是**中心纺锤体**和**中体**。中心纺锤体是指纺锤体中间的部分。后期时，它由锚定在两极中心体上的相互交错的微管末端组成。这些微管并不与着丝粒相连，而是以反平行的方式连在一起。中体是由细胞经历胞质分裂时中心纺锤体的残留部分形成的。像中心体一样，中体包含许多信号分子。

在有丝分裂中肌动蛋白细胞骨架也发生巨大的变化。肌动蛋白是一种重要的细胞骨架分子，它在间期组成胞质纤维丝。细胞进入有丝分裂时，肌动蛋白就在细胞的中间区域集中为胞质分裂做准备，形成分裂沟或细质动力环（见 10.20 *在胞质分裂过程中，细胞质分成两个部分使两个新的子细胞得以形成*）。分裂沟不仅包含肌动蛋白，还有 50 多种不同的调控肌动蛋白丝形成、连结、滑行和周转的蛋白质以及活性受到调控引起分裂沟内陷的蛋白质。

正如所预料那样，这四种主要的有丝分裂蛋白激酶参与这些形态学变化和骨架组织事件的许多方面。一个很著名的例子是 CDK 在核被膜解体中的作用。核纤层由两种蛋白质组成，Lamin A 和 Lamin B。Lamin A 包含 Cdk1 磷酸化位点。研究表明将这些位点突变为不可磷酸化的丙氨酸残基则使核纤层不解体。因此，这些研究确定了 Cdk1 在有丝分裂最早的一个事件中的作用。核纤层的 Cdk1 调节如图 11.26 所示。

蛋白激酶在有丝分裂中发挥着多种作用，与此相对应的是它们存在于细胞内的许多位点。一个重要的位点是中心体。它们除了有作为微管组织中心的作用，中心体也作为细胞周期调节因子和这些调节因子底物聚集的信号中心。以此方式，传递给细胞周期的信号能够被迅速地整合来产生合适的形态上的应答。Cdk1-cyclin、Plk、Aurora 和 NI-

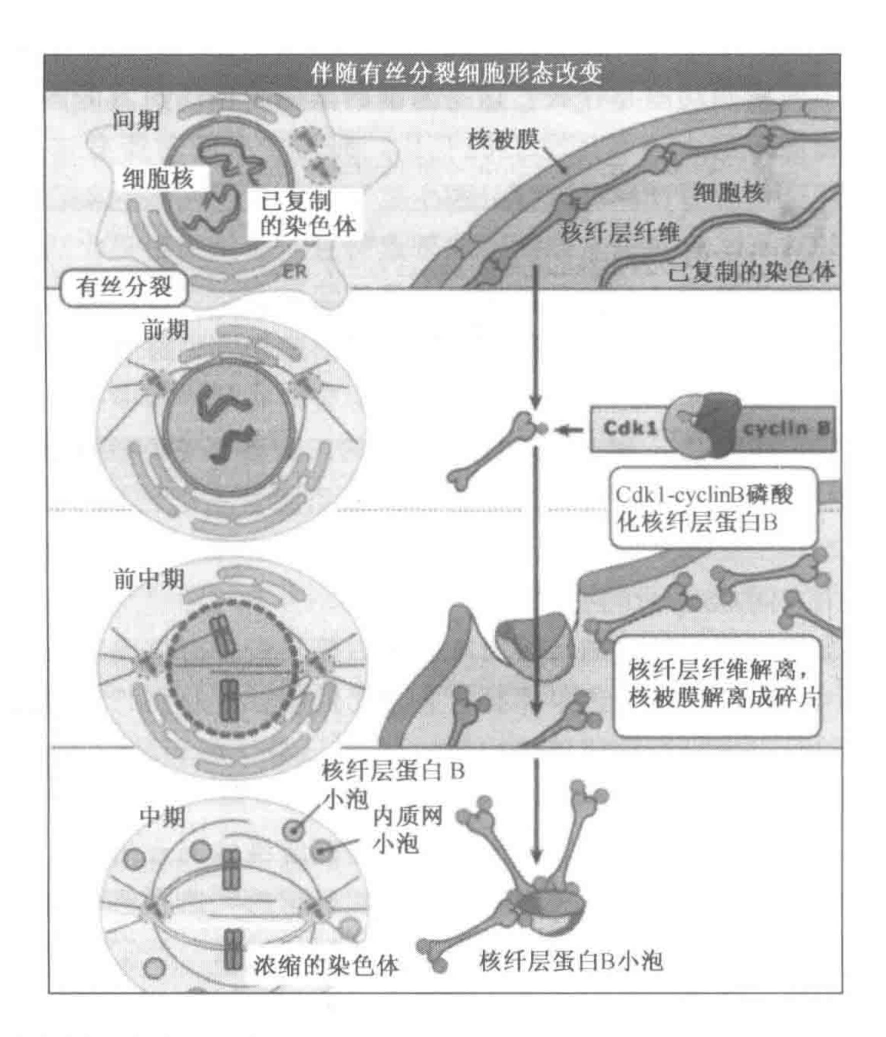


图 11.26　在间期由核纤层蛋白 A 和 B 组成的纤维状核纤层位于核被膜内面。染色体 DNA 浓缩；ER 形状上呈管状，并同核被膜相连。进入有丝分裂时，Cdk 磷酸化核纤层蛋白，导致核纤层和核被膜的解体。ER 也会溶解形成囊泡。染色体浓缩，而且浓缩染色体的动粒区域与中心体发射出的纺锤体微管相结合。细胞自身形态变圆。

MA 家族成员都定位在中心体上，将它们功能去除的研究表明它们调节了中心体的复制和分离。此外，每种激酶在中心体上的底物也已被鉴定出来。

例如，Aurora A 与中心体功能相关，包括在中心体中促进微管成核（中心体成熟）时的变化和纺锤体装配。Aurora A 也为中心体募集因子，这在微管成核中有关键性的作用。

Aurora B 已成为动态定位模式的例子，有丝分裂主要蛋白激酶都显示这种模式。同至少三种称为 INCENP、Survivin 和 Borealin 的其他蛋白质一起，Aurora A 在后期从动粒移动到中心纺锤体，然后移动到正在分裂的细胞的中体区域。基于它们从染色体到纺锤体中区的特征性的移动，这些蛋白质被称为**染色体过客蛋白**。这种复合体的任何成员缺失，染色体将不能正确地浓缩、排列在中期赤道板上，以及同两极中心体的联系。

Aurora B 和动粒上的其他染色体过客蛋白的一个关键功能是解除动粒-纺锤体微管间的连接，这种连接不能在动粒上产生张力，即那些不能使两极连接起来的那些附着。此外，缺少染色体过客蛋白任何功能的细胞都不能成功进行胞质分裂，因为 Aurora B 激酶活性对中央纺锤体和分裂沟的形成都是必需的。虽然 Plk 和 Cdk1 并没有显示出与

Aurora B 相同的定位模式，但是这些蛋白质也在有丝分裂过程中动态性地定位与其靶分子相互作用。

因为蛋白激酶对有丝分裂和胞质分裂的所有方面都是很重要的，许多方法已用来鉴定蛋白激酶底物，以便在分子水平上详细理解有丝分裂过程。特别是许多研究集中鉴定 Cdk1-cyclin 的底物。微管的独特性质之一，尤其是在有丝分裂中，是它们伸长和收缩的速率非常高，这个行为被称为动态不稳定（这个特性发现的细节见EXP：11-0006）。微管的动态不稳定和微管相关动力蛋白的行为对染色体分离过程是很重要的（见 10.4 纺锤体的形成和功能依赖于微管及其结合的马达蛋白的动力学行为）。Cdk1 通过磷酸化微管相关的动力蛋白分子来调节有丝分裂纺锤体的性质。同时，Cdk1 底物包括控制染色体凝缩的蛋白质（见 11.11 有丝分裂染色体的浓缩和分离依赖凝聚蛋白和黏结蛋白）和高尔基复合体分裂和分隔的蛋白质。

总之，在有丝分裂进入和进程中，真核生物细胞的核和胞质中都会发生一些形态学的变化。这些变化大部分都是通过如前所述的有丝分裂激酶磷酸化靶蛋白而引起的。这样的变化的例子有：核纤层的解体、染色体的浓缩、肌动蛋白细胞骨架的再组织、有丝分裂纺锤体的装配和解体以及高尔基复合体的分割。

11.11 有丝分裂染色体的浓缩和分离依赖凝聚蛋白和黏结蛋白

关键概念

- 染色体浓缩并移动到有丝分裂纺锤体的中心从而为分离做准备。
- 染色体通过被称为动粒的特化区域连接到从纺锤体两极发射出的微管上。
- 将姐妹染色单体结合在一起的黏结蛋白释放出来，从而使染色体分离。
- 在胞质分裂前独立的姐妹染色单体在空间上进一步分离。

正如前面所述，在多数细胞中进入有丝分裂的一个显著特点是染色体的浓缩。遗传物质的排列在间期比有丝分裂期松散得多，在有丝分裂过程中，组织形成高度有序的紧凑结构对染色体的分离是非常重要的。这种压缩是如何实现和调控的呢？

染色体浓缩是由一种称为**凝聚蛋白**的多蛋白复合体介导的。这种复合体有两个带有 ATP 酶结构域的卷曲螺旋蛋白，由于历史原因它们属于 SMC 蛋白家族。目前认为凝聚蛋白亚基可能沿着 DNA“行走”，将不同区域拉在一起。凝聚蛋白复合体也包含与 SMC 蛋白一起引起 DNA 构象和拓扑变化从而压缩结构的其他蛋白质。

凝聚蛋白复合体进入染色体是受到严格控制的。复合体只有在有丝分裂中才结合染色体。在裂殖酵母细胞中，核被膜并不解体，凝聚蛋白位于细胞质中而与染色体隔离。在有丝分裂过程中，凝聚蛋白亚基之一的 Cdk1 磷酸化促进复合体有丝分裂期间进入核中。在非洲蟾蜍中，Cdk1 似乎可以刺激凝聚蛋白的超螺旋活性。

染色体相关蛋白的其他修饰，如组蛋白 H1 和 H3 的磷酸化，也是染色体压缩的指标。已知 Aurora 激酶可以磷酸化组蛋白 H3。事实上，现已普遍将有丝分裂过程中的组蛋白磷酸化作为 Aurora 激酶活性的指标。

与染色体浓缩相关的一个过程是姐妹染色单体黏结的建立和维持。随着在 S 期的复制，染色单体在有丝分裂中-后期转换开始分裂前，它们都被束缚着。黏结如何及什么

时候建立？它在后期怎样解体？

与凝聚蛋白复合体的功能相似，**黏结蛋白**复合体从 DNA 复制到姐妹染色单体分离建立并维持姐妹染色单体的黏结。黏结蛋白复合体由两个不同于凝聚蛋白复合体但又与其相关的 SMC 蛋白和另外三种蛋白 Scc1、Scc5 及 Pds5 组成。人们认为黏结蛋白复合体像拉链一样使姐妹染色单体结合在一起。然而，近期有人提出 SMC 蛋白和 Scc1 亚基一起环绕姐妹染色单体维持它们的连接。黏结蛋白的作用机制仍然在研究之中。

关于黏结的解体，有两个解释机制。首先，前期时大部分黏结蛋白从染色体臂上被去除，只有着丝粒处结合的黏结蛋白仍然保留。前期时黏结蛋白的去除是由 Plk1 将 Scc1 磷酸化引起的。在着丝粒处，Scc1 黏结蛋白亚基发生蛋白水解。如果这个黏结蛋白环状模型是正确的，则 Scc1 的裂解打开了黏结蛋白环，允许姐妹染色单体在空间上分离。无论哪个黏结机制是正确的，很清楚 Scc1 的分裂解除了姐妹染色单体的束缚，使有丝分裂后期开始进行。

分离酶（separase）是位点特异性的蛋白酶，它可裂解 Scc1 使姐妹染色单体分离。对大多数细胞周期而言，分离酶通过与**保全蛋白（securin）**结合而保持失活状态。保全蛋白被泛素化，并在中-后期转换时降解。保全蛋白的降解释放出分离酶，将 Scc1 裂解。染色单体分离的过程如图 11.27 所示。因此，在这个简单的模型中，引起染色体分离的事件是

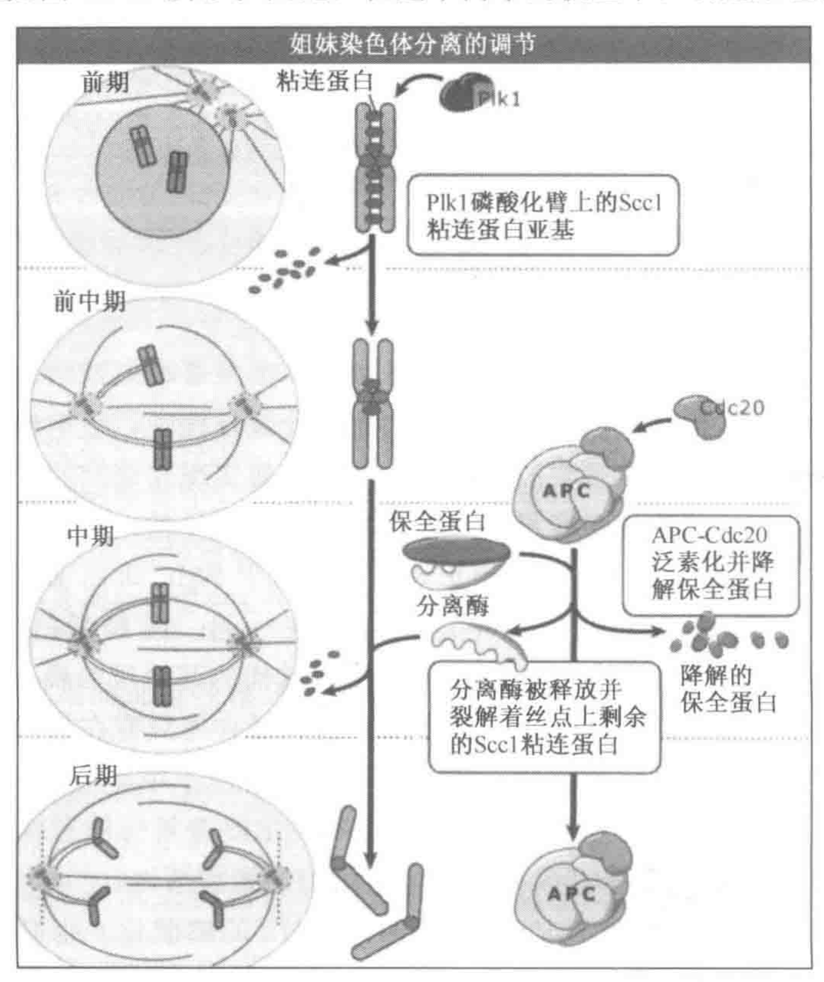


图 11.27　中期前，称为分离酶的蛋白酶被保全蛋白束缚着，处于失活状态。到了中期，APC 以保全蛋白为靶分子将其水解，因此释放出分离酶，解除抑制。然后有活性的分离酶裂解黏结蛋白，使姐妹染色单体分离。

保全蛋白的水解。这样，保全蛋白降解如何被调节就成了一个令人感兴趣的问题。

保全蛋白通过与已知为**后期促进复合体（APC）**的 E3 泛素连接酶相互作用而趋向降解。APC 可以识别包含短的基序如降解框（D 框）和（或）KEN 框的蛋白质。这 9 个氨基酸的序列，加入到另外一个稳定的蛋白质时，也会由 APC 介导降解。不像 SCF（见 11.7 细胞周期的进入受到严密的调控），底物的预先磷酸化不是 APC 识别所必需的。在芽殖酵母中，APC 的基本功能是介导去除细胞周期蛋白和保全蛋白，尽管还存在许多其他靶蛋白。

APC 只有在有丝分裂期和 G_1 期才活化，在这些时期它阻止细胞周期蛋白和保全蛋白的积累。APC 活性是如何被调控的？首先，接头蛋白（Cdc20 和 Cdh1 也称为 APC^{Cdc20} APC^{Cdh1}）与 APC 的结合为 APC 提供了许多暂时的和底物的特异性。这些蛋白仅在有丝分裂和 G_1 期才暂时处于 APC 中。其次，APC 的调控是通过它的 13 个亚基中的若干个被特异性磷酸化以及它的接头蛋白。Cdk1 和 Plk1 都被包含在 APC 的磷酸化和活化中。第三，监控染色体附着的一个信号通路，纺锤体组装检验点（SAC），控制着 APC 的活性（SAC 的细节见 11.15 纺锤体装配检验点监控染色体-微管连接上的缺陷）。这种多个水平的调控确保了 APC 只在有丝分裂过程中才能活化，导致保全蛋白和细胞周期蛋白的水解，释放分离酶，使黏结蛋白脱离，最终使姐妹染色单体分离。APC 在 G_1 期也保持活化状态，使 Cdk1 维持低活性。Cdk1 低活性使 DNA 下一轮复制必需的 pre-RC 形成。APC 的活化如图 11.28 所示。

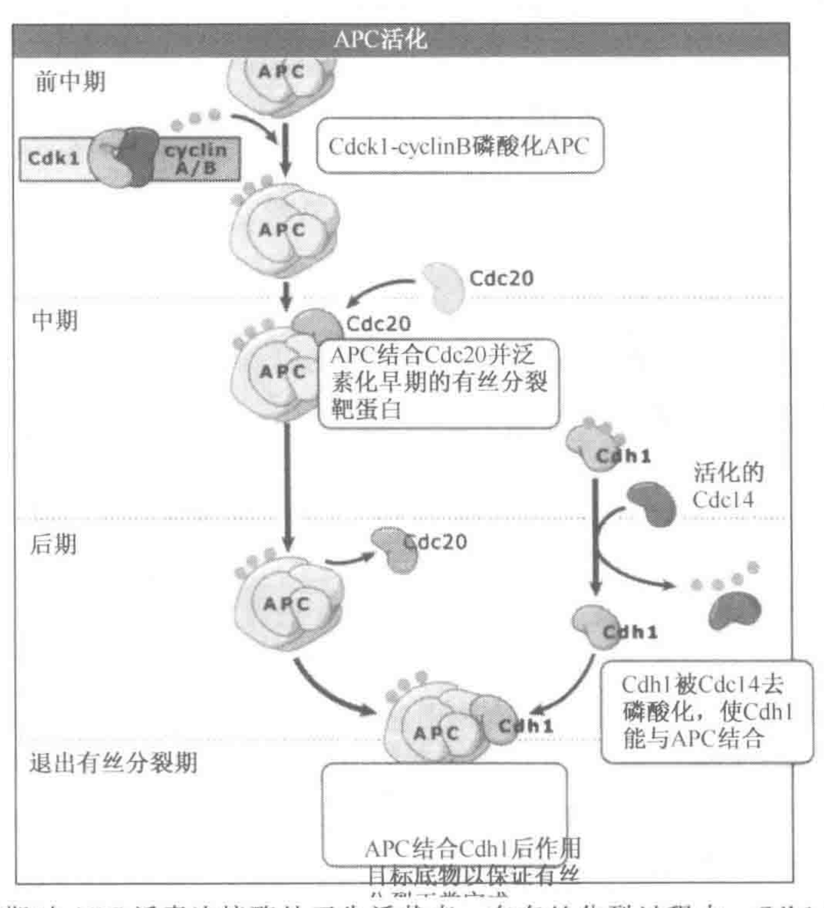


图 11.28　间期时 APC 泛素连接酶处于失活状态。在有丝分裂过程中，Cdk1 磷酸化 APC，APC 会与其活化因子 Cdc20 结合。APC^{Cdc20} 会以如保全蛋白等底物为靶标，保证有丝分裂过程不可逆。稍后，APC 与 Cdh1 活化因子结合，作用于确保有丝分裂正常完成的其他底物。

一旦姐妹染色单体通过裂解黏结蛋白而彼此释放，它们将被纺锤体微管（见 10.18 后期包括两个时相）分向细胞相反的两极。染色体真正分离后，胞质分裂跟着发生，这时 Cdk1 活性降低。

总之，有丝分裂染色体浓缩是由一种称为凝缩蛋白的蛋白复合体介导的，而且姐妹染色单体通过黏结蛋白复合体相互连接，直到后期才分离。黏连的分解需要水解酶（分离酶）将黏结蛋白裂解。而分离酶的活化需要 APC 介导的分离酶抑制因子保全蛋白的降解，这一降解通过泛素介导的蛋白水解完成的。

11.12 完成有丝分裂不仅要求周期蛋白的水解

关键概念

- 有丝分裂完成需要 Cdk1 的失活。
- 有丝分裂完成也包括 Cdk1 磷酸化的逆向反应。
- Cdk1 的失活和 Cdk1 磷酸化的逆向反应与有丝分裂纺锤体的解体和胞质分裂相协调。

我们已经检测了与有丝分裂相关的细胞结构的主要的分子机制和变化。完成一个细胞周期，细胞需要结束有丝分裂返回到间期。我们将讨论这个任务是如何完成的。

Cdk1 高活性启动了有丝分裂阶段。为了让细胞返回间期并开始一个新的细胞周期，Cdk1 必须失活，而且它的磷酸化事件需要逆转。返回间期的这个过程称为有丝分裂完成。Cdk1 的失活如前所述，首先通过泛素依赖的 cyclin B 的蛋白水解来完成，然而还有其他机制。

这个过程的研究者在啤酒酵母中分离出一个突变体 cdc14-3，它滞留在有丝分裂末期，Cdk1 保持着高活性，发现了 Cdk1 活性逆转的另一种方式。我们发现 Cdc14 可以编码一种双重特异性磷酸酶（具有对丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基去磷酸化的能力），它可以将 Cdk1 去磷酸化。转录因子、Swi5、APC 活化因子、Cdh1 和 Cdk1 抑制因子（CKI）、Sic1 都是它的靶分子。

Swi5 的去磷酸化使它在核中积聚，然而 Cdk1 的磷酸化抑制了它的核定位。一旦进入核中，Swi5 就会使 Sic1 的表达增加。另外，Cdc14 将 Sic1 去磷酸化会可阻止 SCF 引起的 Sic1 降解。因此，Cdc14 和 Swi5 协同作用通过增加一种抑制因子的量来抑制 Cdk1。以这种方式，即使 cyclin 没有完全被 APC 降解，Cdk1-cyclin 复合体也无活性。另外，Cdc14 将 APC、Cdh1 底物特异性活化因子去磷酸化，使它与 APC 结合并使有丝分裂 cyclin 趋向蛋白水解。以此方式，APC 随 Cdk1 水平降低和 Cdc14 活性上升继续处于活化状态。

其他真核细胞中 Cdc14 同系物的最新研究表明，Cdc14 磷酸酶家族成员逆转 Cdk1 磷酸化的能力是保守的。然而，多数生物中它的活性不是必需的，此酶在这些生物中的活性已进行了检测。因此，其他磷酸酶必须在逆转 Cdk1 磷酸化事件中起到重要的作用，就像其他有丝分裂激酶催化的磷酸化事件一样，如 Plk、NEK 和 Aurora 等。

蛋白磷酸酶 2A（PP2A）在细胞周期调控中具有许多功能。部分原因是在酵母中这种酶突变表现出细胞周期缺陷。这种含量非常丰富的蛋白质可以通过它的不同的亚基调节作用广泛地直接作用于各种底物。但是，丰富的调节亚基和 PP2A 在细胞进程中的多种生物学作用，意味着在它在有丝分裂完成中所起作用的详细理解上没有取得大的进展。

同样，对于比 PP2 有更多调节亚基的蛋白磷酸激酶 PP1 来说，弄清楚它在有丝分裂中的特异性作用仍是个挑战。然而，基因和细胞生物学研究已经证实 PP1 在有丝分裂的调节中是必需的，PP1 的活性参与逆转 Aurora 激酶介导的组蛋白 H3 的磷酸化和 Aurora 激酶的活化。的确，芽殖酵母中 PP1 和 Aurora 激酶间遗传上和物理上的相互关系预示着这两种酶活性的平衡很有可能调节着有丝分裂进程。然而，有可能存在非 Aurora 激酶介导的磷酸化事件，PP1 逆转磷酸化使细胞走出有丝分裂。

一个有趣的问题是姐妹染色单体分离怎样与 Cdk1 的失活相互协调。这是一个非常重要的问题，因为 Cdk1 的失活早于姐妹染色单体的分离将致使未成熟纺锤体解聚和胞质分裂，从而导致染色体分离异常。一种可能的操控机制是 APC 靶标的逐级降解。例如在芽殖酵母中，APC 介导的保全蛋白和 cyclinB 降解发生在不同时期，而且似乎通过与不同形式的 APC 相互作用而发生（保全蛋白的水解通过 APCcdc20 介导，大量 cyclinB 水解通过 APCcdh1 介导）。通过芽殖酵母的研究也发现稳定的保全蛋白可抑制周期蛋白的降解。这样，生物体中 APCcdc20 将保全蛋白降解导致姐妹染色单体的分离和周期蛋白水解抑制的减弱。

此外，因为大量 cyclinB 在转录中-后期转换时是稳定的，此时 Cdk1 有活性，Cdh1 维持着能阻止它与 APC 相互作用的磷酸化状态。Cdh1 持续磷酸化直到 Cdk1 活性开始

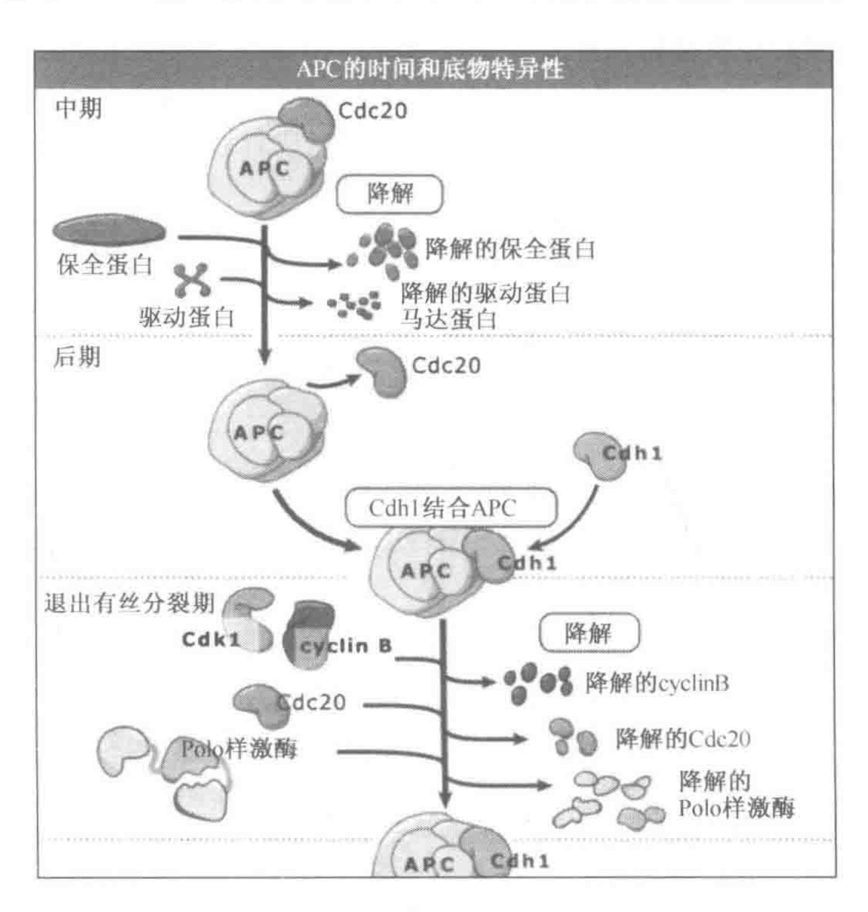


图 11.29 APC 时间和底物特异性。APC^{cdc20} 介导保全蛋白、一系列激酶相关的马达蛋白和部分 cyclinB 的降解。在细胞周期的大多数时期，包括有丝分裂早期，第二个 APC 激活因子 Cdh1 被 Cdk1 磷酸化而不能结合 APC。因为在早后期 APC^{cdc20} 使周期蛋白 B 开始降解，从而 Cdk1 活性开始下降，并且 Cdc14 磷酸酶的激活最终导致 Cdh1 去磷酸化。去磷酸化的 Cdh1 能够结合 APC，APC^{cdk1} 介导周期蛋白的降解和 Cdk1 失活。

下降，Cdc14 活性确保大量的周期蛋白降解，于是 Cdk1 失活仅发生在保全蛋白降解和染色体分离之后。芽殖酵母中，依赖 APC 的蛋白降解短时控制和底物特异性如图 11.29 所示。这个图解中的每个细节是否能应用于所有生物中还不是很清楚，但它是调节细胞周期关键事件复杂性的一个很好的说明。

保全蛋白在芽殖酵母中如何影响周期蛋白的降解？如前所述（见图 11.11），保全蛋白的降解将释放有活性的分离酶，分离酶裂解黏结蛋白，但至少在芽殖酵母中它有另外一个作用，那就是促使 Cdk14 磷酸酶在早后期从其锚定间隔中，即细胞核中释放出来。芽殖酵母中 cdc14 从核中释放使其活化。然后 Cdc14 维持其活性并且通过一个被称为有丝分裂结束网络（MEN）的信号转导通路广泛地分布在细胞中。所以，一旦分离酶被激活，所有的有丝分裂结束事件都将启动。

MEN 信号转导通路包括胞质运动和有丝分裂结束。在裂殖酵母中一个类似的通路控制着胞质分裂和中间隔膜的形成时间，因此被称为分隔起始网络（SIN）。这些通路是由一些小 GTP 酶活性调节的蛋白激酶信号转导通路。在纺锤体两极端组装，MEN 和 SIN 通路总的作用是协调胞质运动和染色体分离。考虑到这种调节的需要，有可能在多细胞真核生物中存在一种类似的通路。的确，这一通路的几个同源组分在动物和植物细胞中已经发现。SIN 和 MEN 通路如图 11.30 所示。一个重要的问题是，MEN 和 SIN 通路中启动胞质分裂的特异性靶分子是什么？

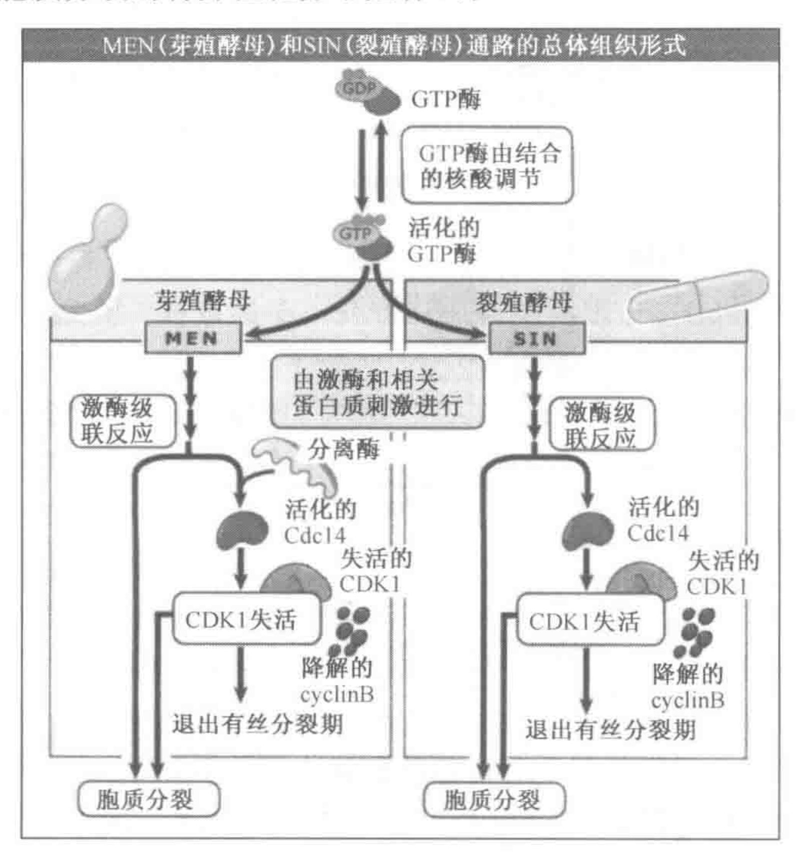


图 11.30　MEN（芽殖酵母）和 SIN（裂殖酵母）通路类似于 GTP 酶调节的信号转导级联反应，GTP 酶在活化形式（GTP 结合）和钝化形式（GDP 结合）之间转换。活性的 GTP 激酶形式刺激下游的蛋白激酶（在 MEN 中三个，在 SIN 中四个）活化，MEN 和 SIN 信号转导促进 Cdc14 家族磷酸酶的活化和胞质分裂。磷酸酶是否在两种酵母胞质分裂中起作用仍不确定。

总之，细胞中 Cdk1 的失活和逐级地逆转磷酸化事件是非常重要的，以至于姐妹染色单体的分离、纺锤体的去组装和胞质分裂协调进行。

11.13 检验点调控使不同细胞周期事件相协调

关键概念

- 细胞周期事件相互协调。
- 细胞周期事件的相互协调是通过特异生化途径的活化来完成的，如果前一个细胞周期事件没有完成，检验点能延迟细胞周期进程。
- 当细胞受到胁迫或损伤时检验点是必需的，但在正常细胞周期中也发挥作用保证各事件间的正确协调。

在每一个有丝分裂的细胞周期中，细胞复制和分离它们的 DNA，然后细胞分裂。细胞周期事件是如何有序进行的？是否发生过这些规律被打破的事件？产生什么样的后果？

如前面所述，特别的监督机制或者检验点，控制着细胞周期事件有序进行。它们通过影响细胞周期主要调控因子如 CDK 和 APC 的活性来完成此过程。

Rao 和 Johnson 的简单但又经典的细胞融合试验（见 11.2 *细胞周期分析的几个实验系统*）不仅仅说明细胞周期进程的主要调控因子，如前面所述，还说明检验点控制的存在。已经发现 G_2 期细胞与 S 期细胞融合，在出现核膜崩解和进入有丝分裂以前，G_2 期细胞核“等待”着 S 期细胞核完成 DNA 复制。可以推测存在一种在 DNA 复制完成之前阻止有丝分裂进行的机制。

关于检验点控制细胞周期事件有序进行，当细胞异常时细胞周期将会被延迟的概念在芽殖酵母 *rad9* 突变体中已经详尽阐明。一些芽殖酵母的突变体，如 *rad* 突变体由于对离子辐射（会造成 DNA 损伤）的敏感性增强被分离出来。通过离子辐射敏感性的筛选可鉴定在 DNA 修复上有缺陷的突变体。

不过，不同类型基因的突变体也能够进行鉴定。显微镜下仔细观察 *rad* 突变体发现末端停滞表型（terminal arrest phenotype）上的差异。大部分 *rad* 突变体从来不会在 DNA 损伤后还仍然分裂。相比之下，*rad9* 突变体细胞在死亡之前会分裂几次，形成小菌落。

大多数 *rad* 突变体的行为表明 DNA 损伤会发出细胞周期延迟的信号，为修复损伤提供时间。因为大部分的 *rad* 突变体含有缺陷的 DNA 修复酶，损伤的 DNA 无法修复，因此这些突变体在一定时期出现细胞周期阻滞。在同样的情况下 *rad9* 突变体细胞的继续增殖表明，在这种突变体中，损伤没有被细胞周期机器觉察到。因此，确立了监测 DNA 完整性依赖 Rad9 检验点的存在，这个检验点可以检测 DNA 损伤，发出终止细胞周期行程的信号。在一个正常的酵母细胞周期中这个检验点不是必需的，只有当 DNA 的完整性受到损害，才成为必不可少。

由于依赖 Rad9 检验点的存在，许多 *cdc* 突变体呈现出一种特殊的细胞周期阻滞。例如，缺少 DNA 复制完成所必需的 DNA 连接酶的 *cdc9* 突变体发生阻滞形成大芽细胞。然而，*cdc9rad9* 双突变并不出现阻滞，它们继续分裂并会死亡。因此，当 DNA 复制不完全时，*rad9* 也将延迟进入有丝分裂。这个把不完全复制的 DNA 与延迟进入有丝

分裂相耦联的信号转导通路称为 DNA 复制检验点。Rad9 在这个检验点中的作用如图 11.31 所示。

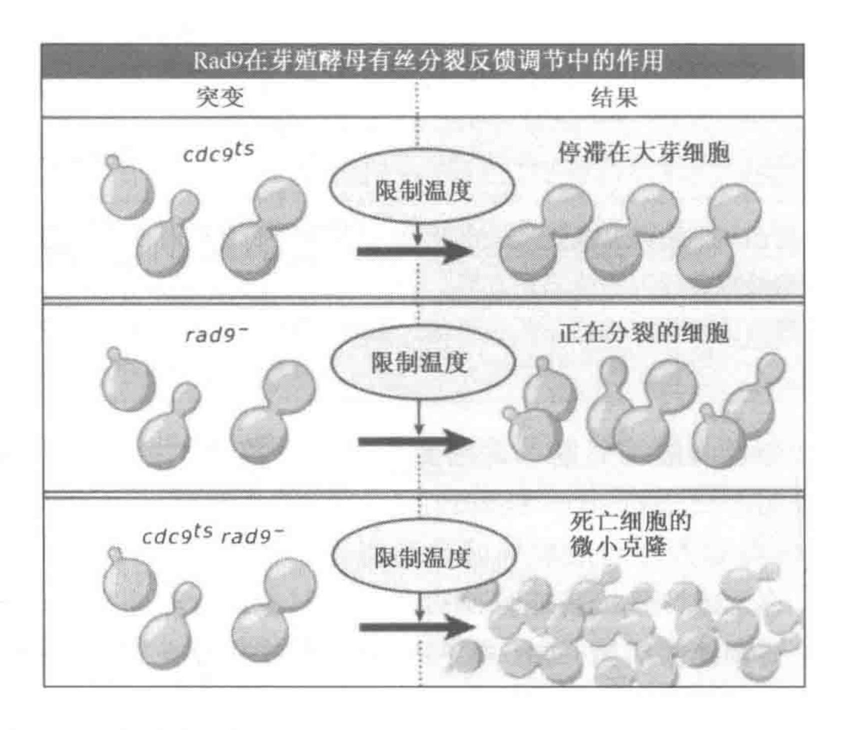


图 11.31 将 $cdc9^{ts}$ 突变体转移到限制温度时，Cdc9p DNA 连接酶功能丧失，并导致 DNA 复制不能完成。突变体细胞都一致地停滞在大芽细胞。当转移到相同的温度下时，缺乏 Rad9p 功能的细胞未显示出可辨认的表型。然而，*cdc9* 与 *rad9* 一起失活会导致不同的致命表型。细胞不会出现周期停滞，并继续细胞周期进程形成死亡细胞的微小克隆。由此确定 $cdc9^{ts}$ 突变体的细胞周期停滞是由于一个需要 Rad9 的检验点。

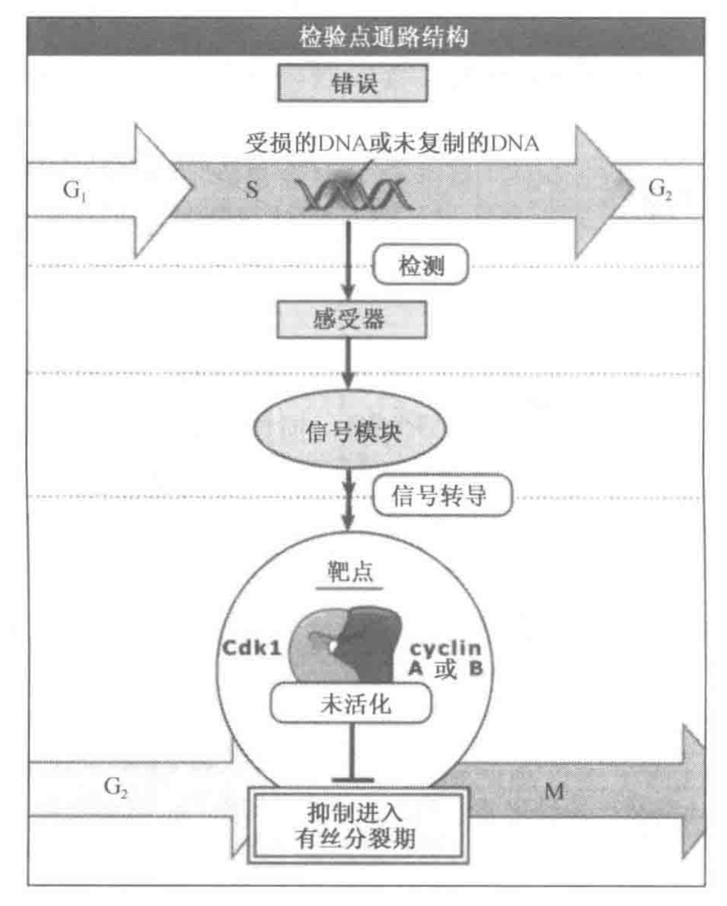


图 11.32 基于对错误的检测（如损伤的 DNA），细胞活化了一个检验点。这个检验点是一个抑制细胞周期进程的信号通路。在这个例子中，检验点通路可通过抑制 Cdk1 活化来阻止有丝分裂的进入。

所有细胞周期检验点由三个不同的部分组成：一是监测事件中缺陷的感受器，二是将信号传递给错误检测器的信号转导模块，三是作为细胞周期引擎组成部分的靶标，调控细胞周期进程的终止。应答 DNA 损伤或 DNA 不完全复制的检验点的基本框架如图 11.32 所示。

11.14 DNA 复制和 DNA 损伤检验点监控 DNA 代谢中的缺陷

关键概念

- 不完全和（或）有缺陷的 DNA 复制可活化细胞周期检验点。
- 损伤的 DNA 活化一个与复制检验点共有一些组成成分的不同检验点。
- DNA 损伤检验点根据损伤发生的不同阶段将细胞周期终止在相应阶段。

在前一部分我们概括地讨论了检验点。现在我们将分别讨论保护细胞的各个检验点。对于细胞来说 DNA 损伤明显是个很大的威胁，基因组的状态也受到连续地监控。还有一个特异的检验点在 S 期监控 DNA 复制的进行。我们现在知道大量蛋白质参与细胞对于损伤 DNA 或者减慢 DNA 复制试剂的应答，很多都列举在图 11.33 中。

DNA损伤检验点应答的关键蛋白			
	酵母		哺乳动物
蛋白质分类	*S. cerevisiae*	*S. pombe*	
感受器	Rad24 Ddc1 Rad17 Mec3 Tel1 Mec1	Rad17 Rad9 Rad1 Hus1 Tel1 Rad3	Rad17 Rad9 Rad1 Hus1 ATM ATR
调节器/传感器	Rad9 Mrc1 Chk1 Rad53	Crb2 Mrc1 Chk1 Cds1	BRCA1 CLASPIN Chk1 Chk2
靶点	Pds1/APC	Cdc25	Cdc25 蛋白家族

图 11.33 已经发现许多进化上保守的蛋白质在检验点应答的每个阶段发挥作用。

目前，损伤感受分子的性质是 DNA 损伤和 DNA 复制检验点方面了解得最少的。但是很明确，DNA 结构的改变，例如局部单链 DNA（ssDNA）或者双链 DNA 断裂（DSB）可以被 DNA 损伤检验点识别。这些异常结构的形成导致保守的相关的蛋白激酶 ATR（具有其接头蛋白 ATRIP）和 ATM 的募集和活化。

在酵母和更高等的真核细胞中，局部 ssDNA 可引起一个依赖 ATR 的应答，然而 DSB 引起的应答是依赖 ATM 的。对芽殖酵母的研究显示了单个 DSB 的存在，在 *cdc13* 突变体中，它随后有一个出现 ssDNA 过程，即 ssDNA 的产生，导致依赖 ATR 同源物 Mec1 激酶的检验点应答。另一方面，哺乳动物细胞用 γ 射线照射产生 DSB，导致 ATM 激酶活性开始增加，紧接着 ATR 激酶活性也增加，这可能是由于 DNA 从 DSB 转变为 ssDNA。很明显，ATM 和 ATR 激酶在感受损伤和转导检验点应答中发挥了关键性作用。在接受刺激的两条通路间可能存在着重要的“对话”。甚至在延续复制叉里，这些区域中

的 ssDNA 能被 DNA 复制检验点检测到，并导致 ATM/ATR 激酶家族的活化。

染色体上的损伤点如何被识别？原子力电子显微镜的研究已经表明 ATM 激酶可以直接与一个 DSB 的 DNA 末端结合。同样的，相关的 ATR 激酶优先结合 UV 诱导的 DNA 结构。这个结合随后同激酶活性的提高和信号扩增相联系。ATM 是如何被激活的呢？ATM 以同型二聚体的稳定状态存在。DNA 损伤引发自磷酸化事件，使得二聚体解聚，将有活性的单体释放出来磷酸化靶分子。

除了 ATM/ATR 家族，进化上保守的 Rad17-RFC 和 9-1-1 复合体可独立地检测 DNA 损伤。Rad17 蛋白家族与复制因子 C 的组分相互作用，形成了一种具有 DNA 结合活性的检验点特异性复合体。随后 Rad17-RFC 复合体将 9-1-1 复合体（人细胞中，由 3 种称为 Rad9、Rad1 和 Hus1 的蛋白质组成）装配到 DNA 损伤点。9-1-1 复合体形成一个同参与 DNA 复制的 PCNA 夹相类似的环状结构。尽管所有这些蛋白质独立地识别和结合 DNA 损伤区域，但是它们对 DNA 损伤检验点都是必需的。它们如何从分子水平上在 DNA 损伤点间相互协调仍然是个急需研究的问题。

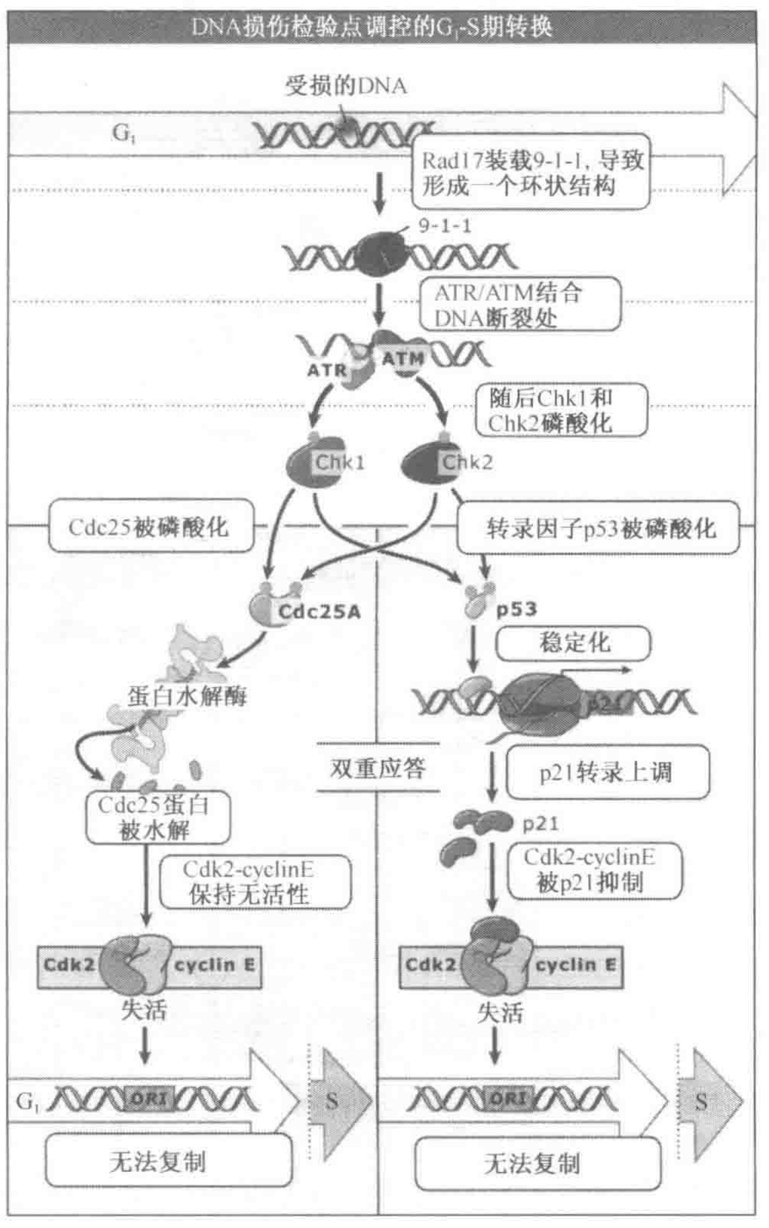
检验点介导因子是另一组蛋白质，对于 DNA 损伤识别、信号转导和 DNA 修复是十分重要的，通常认为这些是在损伤被感应到以后才会发生。它们也被列在图 11.33 中。在这组蛋白质中，检验点功能和 DNA 修复功能之间的界线很模糊，因为有些蛋白质在两种功能中都很重要。介导因子也可能通过组成稳定的多蛋白信号转导复合体参与对 DNA 损伤的应答。

在 DNA 损伤和 DNA 复制检验点中的主要传感器是 Chk1 和 Chk2 激酶。它们直接磷酸化细胞周期引擎的组分从而阻止其活化。

DNA 结构的相同缺陷可以根据它们检测到的阶段，将细胞周期延迟或停滞在不同的阶段。例如，如果损伤的 DNA 在 G_1 期被检测到，细胞周期进程将停止在 G_1/S 转换期。然而，如果同样的损伤在 G_2 期被检测到，有丝分裂的进入将受到抑制。事实上，虽然它们在成分上有重叠，但有 3 种不同的延迟细胞周期进程的检验点，从而应答 DNA 损伤或复制延迟：G_1/S 检验点、S 期检验点、G_2/M 检验点。

哺乳动物细胞中的 G_1 检验点已进行了广泛研究，通过抑制 G_1 期 CDK-cyclin 复合体的活性可延迟 S 期的进入。抑制作用甚至可以在细胞通过限制点（G_1 期 CDK 的细节见 11.6 细胞可以退出和重新进入细胞周期）之后发生。这是如何实现的呢？G_1 期停滞的发生至少有两种方式。一种是抑制 G_1 期 CDK-cyclin 复合体的活化。ATM/ATR 激酶的活化则导致效应子激酶 Chk2 和（或）Chk1 的磷酸化和活化。这些激酶随后将 Cdc25A 磷酸化，并使其从细胞核中排出或通过泛素介导的蛋白质水解作用将其降解。最终结果是 Cdk2-cyclin E 复合体维持在非活化的酪氨酸磷酸化状态。

另一种延迟 G_1-S 转换以应答 DNA 损伤的方式是上调 CKI 表达的转录应答。随着检验点的激活，ATM/ATR 也被活化并磷酸化 p53。p53 是一种转录因子，也是一种重要的肿瘤抑制因子（p53 的细节见 11.6 细胞可以退出和重新进入细胞周期）。ATM/ATR 介导的 p53 磷酸化可以阻止其复原，而 p53 随后则在核中积累。这导致 p53 靶基因转录的增加，其中包括 p21。p21 是一种 CKI，可以抑制 G_1 期 CDK-cyclin 复合体。因此，两个单独的路径促进了对 DNA 复制所必需的 CDK-cyclin 复合体的抑制。应答损伤 DNA 的 G_1 期检验点如图 11.34 所示。



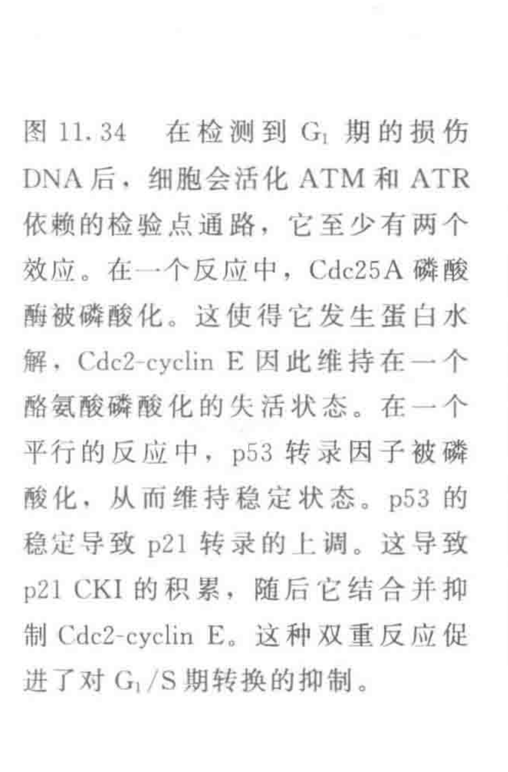


图 11.34　在检测到 G_1 期的损伤 DNA 后，细胞会活化 ATM 和 ATR 依赖的检验点通路，它至少有两个效应。在一个反应中，Cdc25A 磷酸酶被磷酸化。这使得它发生蛋白水解，Cdc2-cyclin E 因此维持在一个酪氨酸磷酸化的失活状态。在一个平行的反应中，p53 转录因子被磷酸化，从而维持稳定状态。p53 的稳定导致 p21 转录的上调。这导致 p21 CKI 的积累，随后它结合并抑制 Cdc2-cyclin E。这种双重反应促进了对 G_1/S 期转换的抑制。

由 S 期和 G_2-M 期 DNA 损伤检验点引起的应答本质上与 G_1 期 DNA 损伤检验点相似。S 期检验点的功能主要是检测到 DNA 损伤后延迟后面的 DNA 起始点的启动，并阻止复制叉解体。在 G_1 期检验点，ATM/ATR 激酶和效应子激酶 Chk1、Chk2 是介导 Cdc25A 和 CDK-cyclin 复合体抑制的关键参与者。另外，有活性的 ATM/ATR 激酶磷酸化复制蛋白，使 DNA 复制停止。例如，ATR-ATRIP 抑制 Cdc7-Dbf4 激酶，因此阻止了必需的复制蛋白的组装。以此方式抑制了 S 期的起始。另外一个重要的检验点激酶靶标是一个保守的处理双链断裂的核酸外切酶复合体，称为 MRN（Mre11/Rad50/Nbs1）。

在一个功能性的 S 期检验点缺乏时，在 DNA 损伤时 DNA 合成继续进行。这个过程称为抗辐射的 DNA 合成（RDS）。如果细胞周期分支（ATM/ATR-Chk1/Chk2-Cdc25A）和终止复制的分支都不具有功能，则 RDS 的程度会增加，这表明在 S 期由 DNA 损伤引发的通路平行起作用。S 期检验点应答如图 11.35 所示。

G_2-M 期检验点与 G_1 和 S 期检验点（见图 11.34 和图 11.35）相类似，在这些检验点中 ATM/ATR-Chk1/Chk2 通路的激活导致 CDK-cyclin 复合体的抑制，这里为 CDK1-cyclin B 复合体。其次，Chk1 和 Chk2 激酶将 Cdc25 家族成员作为靶分子。关于

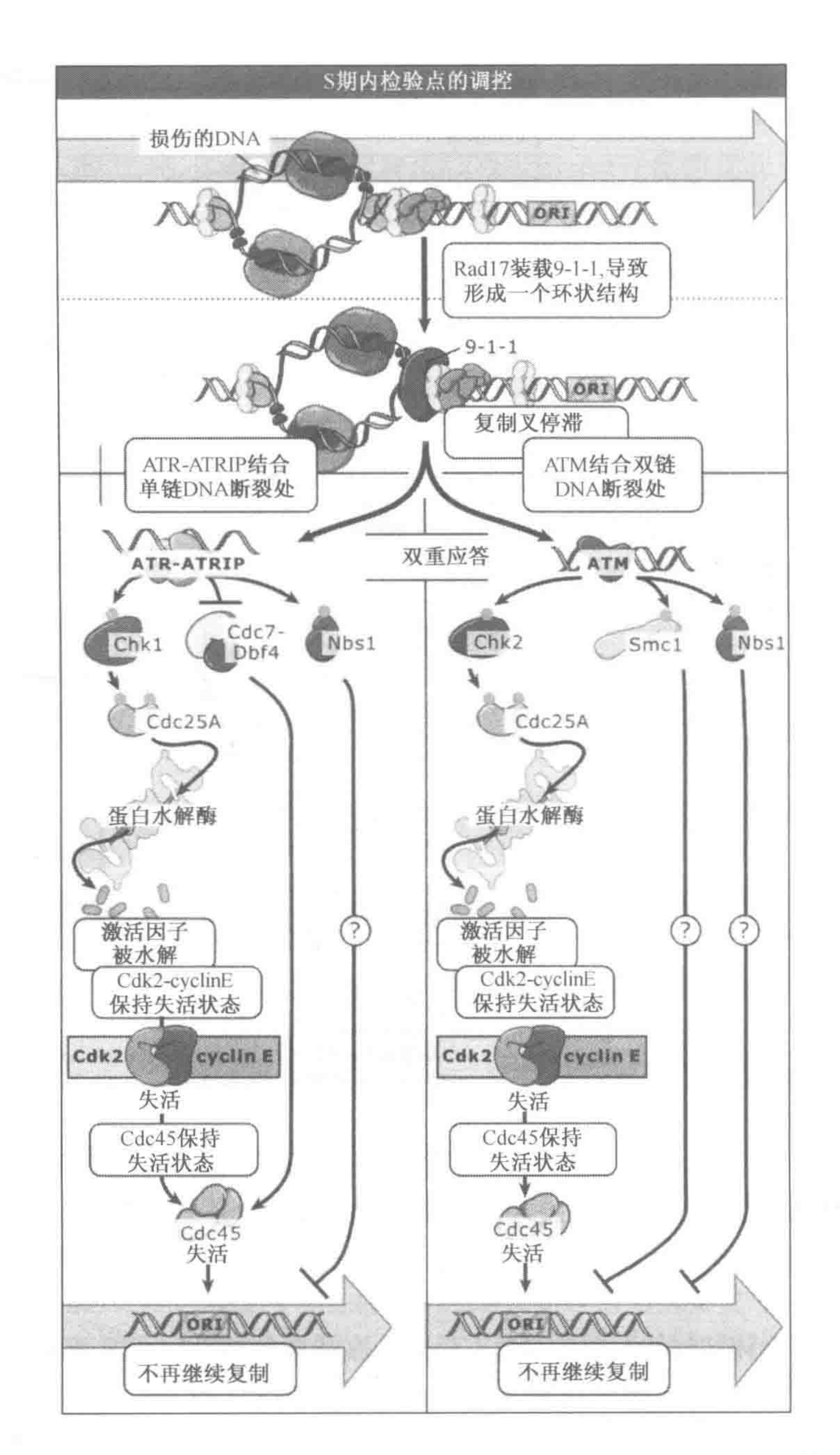


图 11.35 不完全或错误的 DNA 复制产生一个抑制信号，S 期检验点。在错误纠正前这个信号将阻止细胞进入有丝分裂。

G_2-M 期检验点，Cdc25C 和 Cdc25A 都通过钝化和（或）降解而将它们抑制。

活细胞成像法和绿色荧光蛋白标记提供了新的方法去研究在检验点通路中的每一组分起作用的时间和长短。大量检验点蛋白在 DNA 损伤点或终止的复制叉处聚集。假定这些聚集点与检验点信号传递点相一致，研究者正在分析检验点各组分到达的顺序、停留的时间长度、相对的周转，对其他检验点蛋白的依赖性。这些聚集点的显现也是一种检验细胞中被诱导的 DNA 损伤并测量其严重程度的便利的实验途径。

通过 ATM/ATR 使组蛋白 H2AX 的 C 端磷酸化形成 γ-H2AX 似乎为 DNA 损伤聚集点的形成提供了线索。虽然一些检验点蛋白的募集独立于 γ-H2AX，但是这些检验点蛋白在聚集点的持续存在以及检验点应答都依赖它。因此，γ-H2AX 可能组织了一个检验点和修复蛋白的信号中心，监控 DNA 修复的高效进行。

可以想象，DNA 损伤检验点对维持基因组的稳定性起关键作用。检验点蛋白出现异常会导致突变的积累并最终形成肿瘤。的确，人类中称为共济失调-毛细血管扩张（A-T）的一种基因失调与小脑退化、免疫缺陷、辐射敏感性、基因组不稳定性以及肿瘤易患体质相关。A-T 患者中突变基因的克隆揭示这个基因就是 ATM，并且确定其蛋白产物在维持基因稳定性上的作用。ATR 功能的部分失活与罕见的人体常染色体的隐性的混乱，即 SECKEL 综合病症相关。

DNA 复制检验点如何作用？它和 DNA 损伤检验点有区别吗？对多种生物体的研究已证明是终止的复制叉而不是复制不完整的 DNA 激活 DNA 复制检验点。药物引起的 dNTP 库的损耗，如羟基脲，或一些复制酶的突变会在复制已经开始并引起一个检验点应答后终止复制。尽管如此，在未形成复制叉的细胞内，检验点应答不能被这些处理所激活。

一旦激发，DNA 复制检验点有 4 种结果：

- 防止起始点再次启动；
- 复制延长的延缓；
- 终止的复制叉的维持；
- 抑制有丝分裂的进入。

这些复制检验点的功能在图 11.36 中进行了概括。

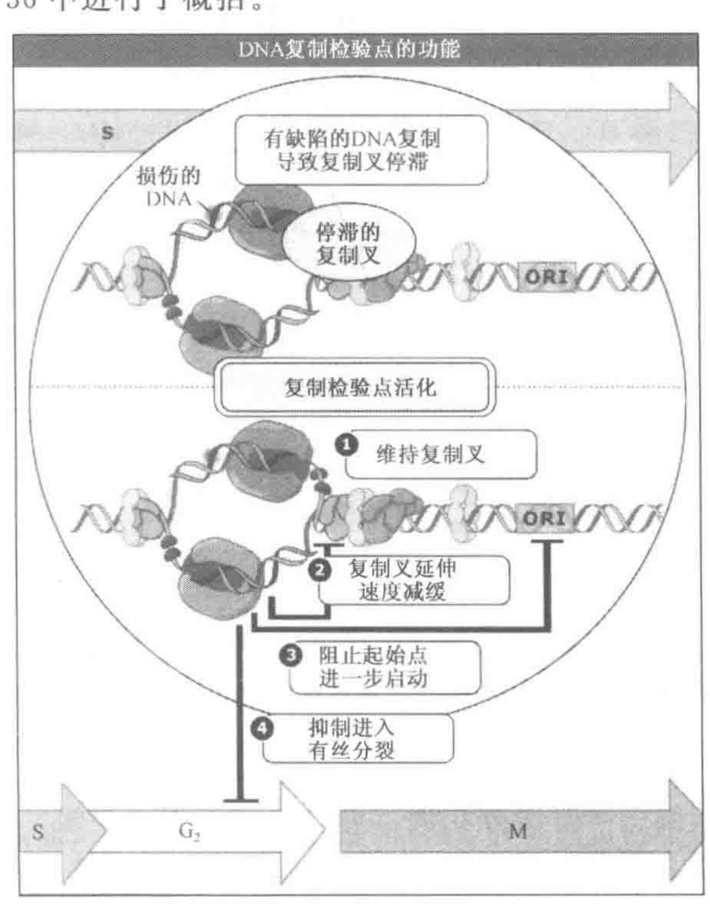


图 11.36 DNA 复制的缺陷会导致复制叉的停滞。这些有缺陷的结构会活化复制检验点，从而（1）阻止起始点进一步启动；（2）减慢复制叉的延伸；（3）维持复制叉和（4）抑制有丝分裂的进入。

很多成分属于复制检验点和DNA损伤检验点共同拥有。例如，中心检验点激酶-ATR或其同源物，以及Chk1或其同源物——将信号传递给Cdc25家族成员抑制CDK-cyclin B和有丝分裂进入，事实上，需要这4种反应中的3种。然而，它们在复制中对于延长的减缓不是必需的，检验点的这个方面还不是很清楚。

11.15 纺锤体装配检验点监控染色体-微管连接上的缺陷

关键概念

- 在有丝分裂过程中有丝分裂纺锤体附着在染色体单个动粒上。
- 微管在动粒上的正确附着是染色体分离的一个先决条件。
- 纺锤体装配检验点能感受到纺锤体-MT附着缺陷，从而停止中-后期转换，阻止姐妹染色单体分离中的错误。

在有丝分裂早期，纺锤体微管（MT）附着在动粒上，它是组装在染色体着丝粒DNA上的蛋白复合体。染色体可以均一地分配到子细胞中，因此在后期开始前姐妹染色单体的动粒附着到从纺锤体两极发出的MT上是必需的。这样的附着模式称为双定向或两极附着。

由于MT与动粒的附着是一个随机过程，在中期，动粒-MT附着会出现其他模式。动粒-MT附着的不同可能性如图11.37所示。

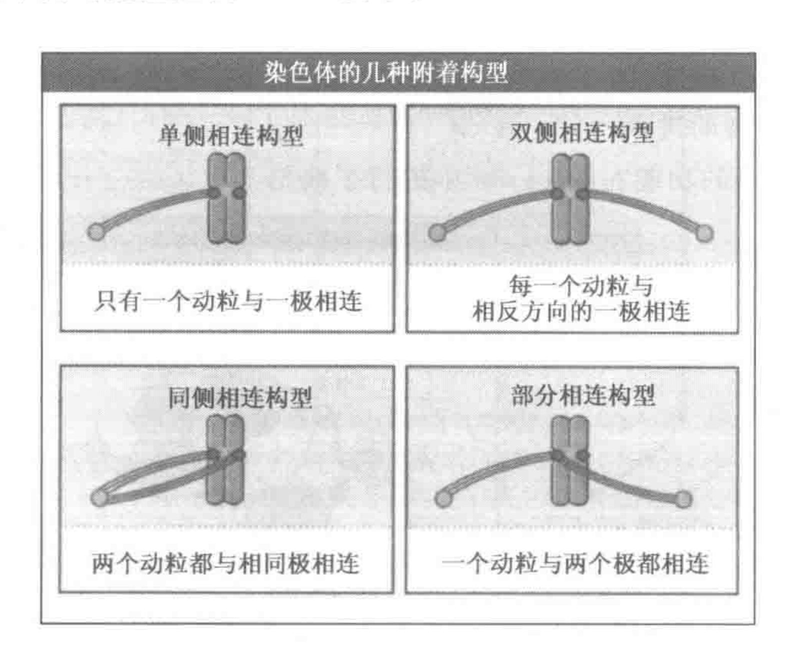


图11.37 在单侧相连构型中，动粒中只有一个与锚定在一极的纺锤体纤维相连。在双侧相连构型中，姐妹染色单体的动粒被连接在从相反两极发射出的纺锤体微管上，引起正确的染色体两极定向。在同侧相连构型中，姐妹染色单体的动粒都与由相同极发射出的纺锤体微管相连。在部分相连构型中，一个动粒同从两极发射出的纺锤体微管相连。所有的错误构型都会被纺锤体装配检验点检测到，导致有丝分裂进程中断。

细胞具有区分正确（两极）和错误（单极）附着的机制。事实上，在中期，若干蛋白质参与将错误的动粒-MT附着模式转变为双定向模式。使错误附着不稳定

的一个关键蛋白是蛋白激酶 Aurora B。如前所述，Aurora B 是染色体过客复合体的一个组分，并在有丝分裂过程中定位于动粒上（见 11.9 有丝分裂由几种蛋白激酶协同完成）。Aurora B 激酶如何作用来促进两极纺锤体附着成为目前研究的热点问题。

当一些染色体并没有以双定向形式附着在纺锤体上，或完全没有附着在纺锤体上时将会发生什么？在这种情况下，一个“等待-后期”信号将会由“纺锤体装配检验点”（SAC）产生。这个检验点的作用是延迟姐妹染色单体的分离，即直到每条染色体都正确地附着到纺锤体微管上后期才会开始。如果“等待-后期”信号没有产生，则姐妹染色单体就会在成熟前分离，结果是染色体的不均等分离。SAC 可以通过阻止 APC 的活化而阻止后期的开始，也阻止了保全蛋白的裂解（APC 的细节见 11.11 有丝分裂染色体的浓缩和分离依赖凝聚蛋白和黏结蛋白）。

SAC 是如何被活化的？未附着或没有正确附着到纺锤体 MT 的动粒将 SAC 活化。虽然未附着的动粒明显诱导 SAC 的活化，但是其他研究表明每个动粒间物理张力的缺乏会导致 SAC 的活化。在有可能从分子水平上认识 SAC 之前，在蝗虫精母细胞中观察到 SAC 活化的效应。这些细胞有三条性染色体，并且在一些细胞中，这三条染色体中的一条未配对，且只和纺锤体的一极相连接。包含一个未附着的动粒的细胞就不再能使后期起始并最终退化。在一系列精确的实验中，用一个显微操作针继续拉动未附着的染色体。这一操作诱导了后期，表明动粒间的张力对解除 SAC 抑制是非常重要的。

正如我们所想象的，MT 与姐妹染色体动粒两极附着的结果使它们之间产生了张力，而动粒-纺锤体附着的其他模式则不能产生这种张力。现在产生的一个模型是，与动粒附着和成对动粒间的物理张力都是 SAC 监控的重要参数。

SAC 和它的组分最初在芽殖酵母突变体的遗传筛选中被鉴定出来，这种突变体显示出对微管去稳定药物敏感。然而，SAC 也存在于多细胞真核生物中。有趣的是，SAC 组分对酵母营养性生长并不是必要的，但是在目前检测的例子中，它们在鼠中的相应组分对胚胎生存能力是必不可少的。从鼠胚胎获得的缺乏某些 SAC 组分的细胞系显现出染色体不能正确分离的现象明显增加。在多细胞动物细胞中，对 SAC 的需要可能是由于正确的染色体排列和动粒-MT 附着需要更长的时间，在这个过程中 APC 必须保持失活状态。SAC 的作用如图 11.38 所示。

SAC 如何作用来延迟后期？关于 SAC 分支的检测和信号转导还有很多仍然需要研究。尽管如此，很明显可以看到，SAC 活化的信号由动粒发出。无论是在每个正常的细胞周期中还是检验点活化的周期中，所有的 SAC 组分都已在动粒中被检测到，这些表明这是它们最初的活动位点。而且，现已表明 SAC 组分的动粒靶标对检验点信号的建立和维持是必不可少的。由动粒蛋白突变引起的动粒结构的某些缺陷可以阻止 SAC 组分在动粒上的组装。这些突变体的检验点处于失活状态。动粒的其他结构缺陷事实上可以引起 SAC 的活化。

我们知道 SAC 信号转导包括一个磷酸化级联反应，因为一些 SAC 组分是蛋白激酶，而许多 SAC 组分都被磷酸化。然而，越来越多的证据表明 SAC 并不通过一个严格的线性途径传输信号。例如，不同组分在监控正确的两极附着的不同方面发挥非常重要

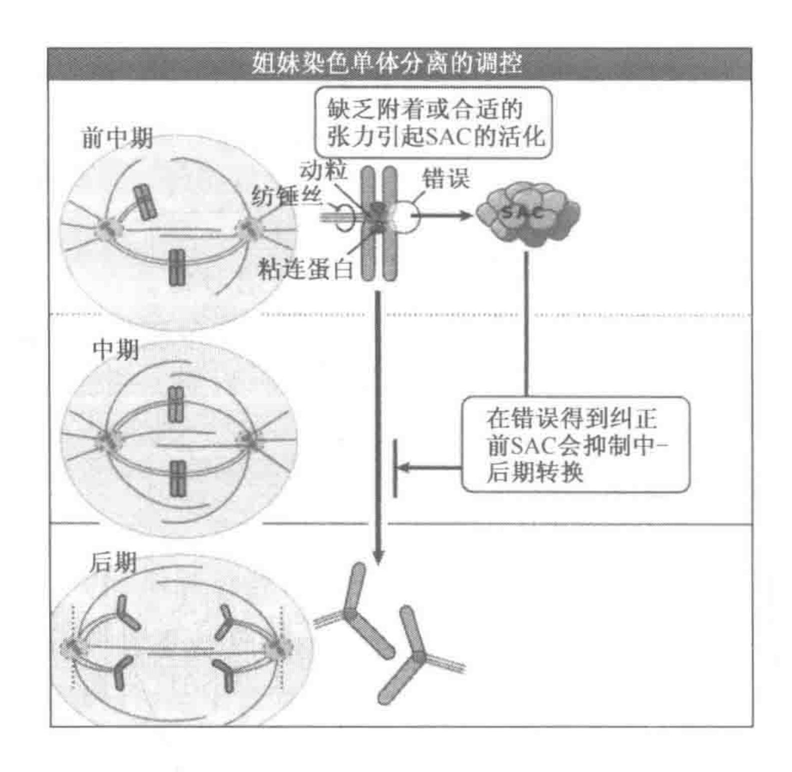


图 11.38　一个动粒缺乏与微管附着或姐妹动粒间缺乏合适的张力会活化纺锤体装配检验点（SAC）。在错误得到纠正前 SAC 会抑制中-后期转换。

的作用。同时，蛋白激酶组分是否存在多个靶标还不清楚。

已鉴定出 Cdc20 为 SAC 活化后的一个靶标。如前所述，Cdc20 是 APC 的一个底物特异性活化因子。Cdc20 与一种保守的检验点蛋白 Mad2 结合，这表明 Mad2 可以通过结合 Cdc20 来抑制 APC。最近，一种有丝分裂检验点复合体（MCC）与 Cdc2 一起被鉴定出来，它包含三种检验点蛋白——Mad2、BubR1 和 Bub3。虽然 Mad2 如何独自或同 MCC 一起传递信号来延迟后期仍然不清楚，但是可以明显看到，一旦检验点活化，APC^{Cdc20} 就会失去活性，并使保全蛋白保持稳定和姐妹染色单体维持黏结。APC 活性的 SAC 抑制模型概括在图 11.39 中。

SAC 的主要功能是在姐妹动粒缺乏正确的两极附着时阻止染色体分离。正如人们所预测的那样，SAC 正常功能的缺乏时，动粒附着的缺陷会导致染色体错误分离和细胞死亡或出现非整倍单倍体，这样的子细胞获得的遗传物质较平均分配的多或者少。事实上，许多形式的肿瘤都是典型的非整倍单倍体，并且 SAC 组分的突变与一些类型的结肠直肠癌相关。通过删除一条染色体拷贝来降低鼠中 Mad2 水平的实验提供了强有力的证据，证明有丝分裂期 SAC 参与防止染色体的损伤。这种鼠是易发生肿瘤的，而且缺乏 Mad2 功能的细胞中染色体不正确分离事件发生率很高。

总之，纺锤体装配检验点保证了只有在所有的染色体都正确地附着在有丝分裂纺锤体上后染色体分离才会发生。因为染色体的分离是由 APC 活性引起的，那么在染色体正确附着前检验点通路将阻止 APC 的活化。检验点信号由动粒起始，并引起一些检验点组分直接同 APC 结合来抑制其功能。

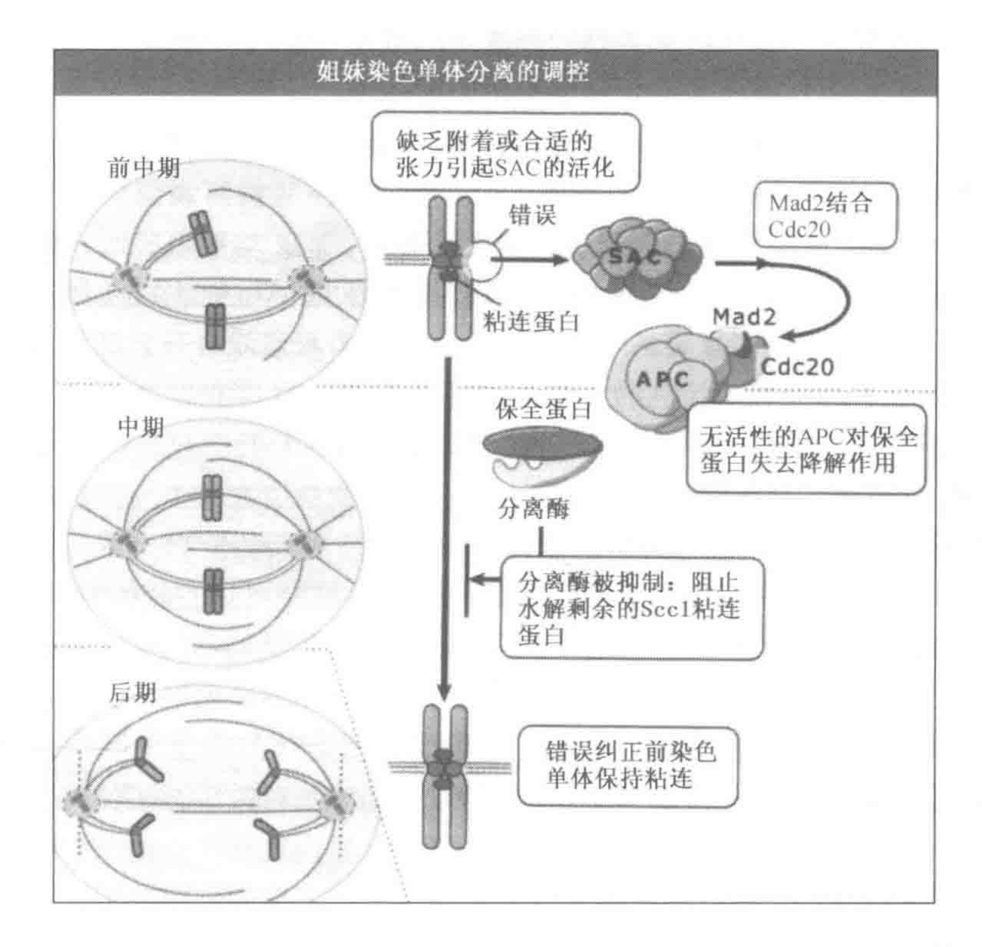


图 11.39 当纺锤体装配检验点（SAC）被活化，SAC 的组分 Mad2 或 SAC 组分的一个复合体（MCC）与 APC 的一个活化应子 Cdc20 的结合，会抑制 APC^{Cdc20} 的活性。对于以保全蛋白为靶标的蛋白水解以及使姐妹染色单体分离来说，APC^{Cdc20} 是必需的。

11.16 细胞周期失控导致癌症发生

关键概念

- 原癌基因编码驱动细胞进入细胞周期的蛋白质。
- 肿瘤抑制基因编码抑制细胞周期事件的蛋白质。
- 原癌基因、肿瘤抑制基因或检验点基因的突变可能导致癌症。

如同前面所强调的，细胞中有多种调控确保细胞分裂毫无差错地进行。这些调控确实很重要，因为它们确保了染色体复制和分离的完整性和保真度。调控细胞增殖保真的基因突变将会导致癌症。

有两种类型基因的突变会导致不可限制的细胞增殖。这两种类型基因为**原癌基因**和**肿瘤抑制基因**（这些基因的细节见第 13 章*癌症——原理和概述*）。原癌基因和肿瘤抑制基因以相反的作用调节细胞增殖。原癌基因之所以这样命名是因为它们正常情况下参与促进细胞增殖，这些基因的上调和变异将给细胞传递错误地或持续不断地增殖的信号。事实上，它们可以突变成为致癌基因。相反，肿瘤抑制基因通常抑制细胞增殖，并确保基因组的稳定。因此，一个肿瘤抑制基因的两个拷贝功能都丧失的突变会导致生长失去调控，并参与肿瘤的形成。环境因子在癌症形成中起到了重要的作用。将人类细胞暴露

在诱变剂/致癌物质，如紫外线和香烟的烟雾中，就会引起一个原癌基因或肿瘤抑制基因的突变。

p53是一个关键的**肿瘤抑制基因**，它通常的作用是抑制细胞周期进程（见EXP：11-0007）。它也是一个检验点基因。p53蛋白功能的机制和调节是当前研究的焦点问题，因为大多数人类肿瘤包含了p53的失活突变。p53功能缺乏时，细胞可以逃离细胞周期调节的监控，并在DNA损伤的情况下增殖。这使得细胞在随后的分裂中由于各种变异而受到伤害。一些重要的生长调控基因突变的积累就会导致肿瘤的形成。

DNA受损伤时，检验点蛋白的突变可以致使细胞周期进程继续进行。例如，鼠和人的细胞系中检验点蛋白Husl的失活，使细胞对于DNA损伤药物敏感化，同时使细胞在DNA损伤的情况下细胞周期进程仍然进行。

在癌细胞中观察到DNA分离时的基因突变也会造成遗传变异。染色体的不稳定性（CIN）是一种已形成的癌细胞的标志。近来研究表明CIN可以直接由有缺陷的SAC信号诱发，而不是产生于转化状态的结果。例如，Mad2作为SAC的一种组成成分，是E2F的转录靶分子，因此，在E2F不受调节的细胞中，Mad2水平上升且染色体分离出现异常。Mad2的突变或SAC其他成分的突变也在特定种类的癌细胞中被发现。综上所述，这些近期研究表明SAC检验点的运行和SAC的及时失活对于保持基因稳定性来说是很重要的。

总之，若原癌基因、肿瘤抑制基因及检验点基因发生突变，该个体癌发生的危险性就很高。对于癌症更详细的讨论见第13章*癌症——原理和概述*。

11.17 展望

随着基因组测序计划的完成，全球科学家都开始研究细胞周期过程中基因和蛋白质功能的变化。芯片技术已被广泛应用于细胞周期或加入抑制细胞周期进程的药物后基因组在转录过程中的变化。对芽殖酵母和裂殖酵母的基因表达做了全面的分析，鉴定出了在细胞周期中受到转录调控的基因。同时，将芯片用于分析鉴定在转录过程中激活检验点上调或下调的基因。这一方法还应用于其他生物，来研究细胞周期调控和检验点激活的普遍调节模式，以及鉴定正常和转化动物细胞之间的差异。目前芯片技术应用于肿瘤整体分析和确定对病人的诊疗方法。

近期正在采用细胞周期调控蛋白的另一种研究方法，即蛋白定位的整体分析。以芽殖酵母和裂殖酵母为例，几乎每一种基因组编码的蛋白定位都被测定，其方式是将每一个可阅读框与绿色荧光蛋白相融合。同时，即将开始的大规模蛋白质组分析将测定所有具有细胞功能的多聚复合体中的蛋白质组成。这种分析可以增进我们对细胞中不同蛋白质和蛋白质复合体的功能认识。

鉴于检验点在细胞周期事件中的重要性，研究它们的整体运行和分子调控机制是十分必要的。DNA损伤、S期以及纺锤体装配检验点需要一系列蛋白激酶功能。然而，这些激酶中只有一小部分的作用底物被查明，确定更多的作用底物和了解这些激酶的磷酸化结果是十分必要的。解决这些问题将十分有助于理解检验点在保持染色体精确地分离与分配中所发挥的作用。

同样，尽管我们对有丝分裂激酶调控信息有所了解，但仍然需要对它们的作用靶标

进行更深入的研究。将酵母的遗传学研究与蛙和海胆提取液的生化分析结合起来极大地促进了对有丝分裂 cdk1 的研究。然而，这一工作尚未完成。cdk1 如何调控诸如染色体浓缩、纺锤体形成及姐妹染色体分离等一系列极为重要的有丝分裂进程？确定和分析 cdk1 的有丝分裂底物可以帮助我们理解这一过程的分子机理。同时，研究 cdk1 功能如何下调结束有丝分裂也同样重要。cdk1 活性下降与纺锤体解聚和胞质分裂有何联系？这些过程是否受 cdk1 的去磷酸化作用影响？假设确实如此，去磷酸化又是如何调控该过程的呢？

质谱技术的大力发展极大地推进了对蛋白修饰（如磷酸化）的研究。化学遗传学已经作为一种强有力的新技术帮助我们进行蛋白激酶作用底物的研究。这一方法利用修饰后激酶的特定抑制因子来测定该激酶在特定磷酸化事件中的作用。这类敏感度类似的等位基因（不能利用 ATP 的激酶突变等位基因）对体内选择特定激酶的抑制作用及鉴定激酶的作用靶标很有意义。这些方法必将有助于研究者探讨以下的问题：细胞周期中各特定阶段哪些蛋白质发生磷酸化？这些蛋白质的去磷酸化是否会使激酶失去功能？这些问题的解决将使我们对蛋白激酶如何调控细胞周期有一个更为全面的认识。

蛋白激酶是细胞周期中的重要调节因子，定向蛋白水解使得细胞周期不可逆地进行。SCF 和 APC 是细胞周期中两个研究得较为透彻的泛素连接酶，泛素依赖型蛋白水解的异常与肿瘤的发生有关。因此，全面了解泛素依赖型蛋白水解中涉及的所有蛋白质对研究细胞周期及肿瘤发生很有必要。有关这一问题的研究现已开始。比如，利用精巧的体外系统，在蛙的提取物中鉴定出一类涉及有丝分裂特异性蛋白质水解的蛋白质。扩大这项分析可以建立一个更大的有丝分裂特异性水解蛋白的清单，并严格确定 SCF 和 APC 的作用底物，可以进一步明确泛素依赖型蛋白水解在细胞周期中的作用。而且，更深入地了解细胞周期特异的蛋白质水解，将为疾病的诊疗提供新的靶点。

肿瘤治疗最大的障碍在于确定选择性杀伤癌细胞的治疗药物靶点。对细胞周期调控进一步的研究可以使我们了解如何操控细胞周期阻止异常的细胞分裂。确定细胞周期进程中不同方面的蛋白质可以为抗癌治疗提供一系列的靶点。同时，新发现的细胞周期调控基因的增加，将有助于通过遗传指纹分析技术确定特定肿瘤的发病危险及药物介入治疗的机会。

11.18 总结

细胞周期包含一系列有序事件，使细胞内含物复制并分裂为两个子细胞。一个细胞周期的各种事件在时间上和空间上受到调节。正如我们所了解的检验点这一监视机制可以保证细胞周期进程的有序性及精确性。如果在复制过程中出现错误，检验点将会延迟细胞周期进程以保证细胞周期的正常进行。

遗传信息的复制发生在 S 期，复制的信息平均分配发生在有丝分裂期。这两个时期被间期分隔，即 G_1 期和 G_2 期。这一顺序受到检验点的监督以及蛋白激酶 CDK 的调控。一些事件只有在 Cdk1 活性低时才能发生（装配复制前复合体），而一些事件只有在 Cdk1 活性升高时（有丝分裂）时才会发生。伴随着 Cdk1 和其他一些保守的蛋白激酶的活性达到最高值，细胞进入有丝分裂期。这些激酶共同调控染色体分离装置——纺锤体。在姐妹染色体连接到来自两极的纺锤体后，姐妹染色体在纺锤体延长的作用下于

末期迁移至细胞两极。后期姐妹染色体的分离需要泛素连接酶、APC。进入后期，Cdk1 的活性下降，这样可确保下一个细胞周期时 S 期的进行。

细胞外刺激决定正常细胞进入分裂周期还是处于静止不分裂状态。这些信号包括营养状况、细胞之间的接触状况及生长因子的存在与否。由胞外刺激产生的生化信号本质上既可以有促进作用又可以有抑制作用。大部分情况下，这些信号影响 G_1 到 S 期的转换点，在大多数细胞中这一转换点是主要的细胞周期控制点。S 期的开始、G_2 期到 M 期的转换点以及后期的起始都受到检验点的控制。这些检验点可以推迟细胞周期进程直至各种必要条件得以满足，以确保细胞周期的精确性。检验点机制的缺陷使细胞复制进程中的错误延续到下一代，并导致增殖失控和肿瘤发生。两种不同类型的突变引起肿瘤的形成：肿瘤抑制基因的失活和主要致癌基因的活化突变。单一的突变不易独立引发肿瘤，还需要其他突变的发生，使细胞遗传稳定性丧失，并强化了肿瘤形成的危险。

参考文献

11.2 细胞周期分析的几个实验系统

综述

Osmani, S. A., and Mirabito, P. M., 2004. The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* v. 41 p. 401–410.

研究

Fantes, P,. and Nurse, P., 1977. Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp. Cell Res.* v. 107 p. 377–386.

Hartwell, L., Culotti, J., Pringle, J. R., and Reid, B. J., 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* v. 183 p. 46–51.

Hartwell, L. H., Culotti, J., and Reid, B., 1970. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 66 p. 352–359.

Johnson, R. T., and Rao, P. N., 1970. Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* v. 226 p. 717–722.

Lehner, C. F. and Lane, M. E., 1997. Cell cycle regulators in *Drosophila:* downstream and part of developmental decisions. *J. Cell Sci.* v. 110 (Pt 5) p. 523–528.

Nurse, P., 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* v. 256 p. 547–551.

Nurse, P., Thuriaux, P., and Nasmyth, K., 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* v. 146 p. 167–178.

Nurse, P., and Bissett, Y., 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* v. 292 p. 558–560.

Rao, P. N., and Johnson, R. T., 1970. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* v. 225 p. 159–164.

11.3 细胞周期需要不同事件间的协调

综述

Elledge, S. J., 1996. Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* v. 274 p. 1664–1672.

11.4 细胞周期就是CDK的一个活性周期

综述

Hunt, T., 1991. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* v. 2 p. 213–222.

Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J. V., Wu, M., and Hunt, T., 1989. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J. Cell Sci. Suppl.* v. 12 p. 77–97.

Morgan, D. O., 1997. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 261–291.

Nurse, P., 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* v. 344 p. 503–508.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P., 1996. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* v. 3 p. 696–700.

Stern, B., and Nurse, P., 1996. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* v. 12 p. 345–350.

研究

Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P., 1982.

Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* v. 300 p. 706–709.

Brown, N. R., Noble, M. E., Lawrie, A. M., Morris, M. C., Tunnah, P., Divita, G., Johnson, L. N., and Endicott, J. A., 1999. Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 8746–8756.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T., 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* v. 33 p. 389–396.

Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J., 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. *Cell* v. 54 p. 433–439.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout, W. M., Bronson, R. T., Gardner, H., and Sicinski, P., 2003. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* v. 114 p. 431–443.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. P., 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* v. 376 p. 313-320.

Lee, M. G., and Nurse, P., 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature* v. 327 p. 31–35.

Lohka, M. J., Hayes, M. K., and Maller, J. L., 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 85 p. 3009–3013.

Nurse, P., Masui, Y., and Hartwell, L., 1998. Understanding the cell cycle. *Nat. Med.* v. 4 p. 1103–1106.

Parisi, T., Beck, A. R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z., and Amati, B., 2003. Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J.* v. 22 p. 4794–4803.

Rosenthal, E. T., Brandhorst, B. P., and Ruderman, J. V., 1982. Translationally mediated changes in patterns of protein synthesis during maturation of starfish oocytes. *Dev. Biol.* v. 91 p. 215–220.

Schulman, B. A., Lindstrom, D. L., and Harlow, E., 1998. Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 95 p. 10453–10458.

11.5 CDK-cyclin复合体受到多种方式的调控

综述

Coleman, T. R., and Dunphy, W. G., 1994. Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 6 p. 877–882.

Deshaies, R. J., 1997. Phosphorylation and proteolysis: Partners in the regulation of cell division in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 7 p. 7–16.

Harper, J. W., and Elledge, S. J., 1998. The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev.* v. 12 p. 285–289.

Nurse, P., 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* v. 344 p. 503–508.

Pavletich, N. P., 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* v. 287 p. 821–828.

Pines, J., 1999. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* v. 1 p. E73–E79.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* v. 13 p. 1501–1512.

Tyers, M., and Jorgensen, P., 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 10 p. 54–64.

研究

Gould, K. L., and Nurse, P., 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* v. 342 p. 39–45.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P., 1996. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* v. 382 p. 325–331.

11.6 细胞可以退出和重新进入细胞周期

综述

Blagosklonny, M. V., and Pardee, A. B., 2002. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* v. 1 p. 103–110.

Campisi, J., 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* v. 120 p. 513–522.

Deshaies, R. J., 1997. Phosphorylation and proteolysis: Partners in the regulation of cell division in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 7 p. 7–16.

Elion, E. A., 2000. Pheromone response, mating and cell biology. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 3 p. 573–581.

研究

Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., Gertler, F. B., Mendenhall, M. D., Sicheri, F., Pawson, T., and Tyers, M., 2001. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* v. 414 p. 514–521.

11.7 细胞周期的进入受到严密的调控

综述

Sherr, C. J., 1995. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* v. 20 p. 187–90.

Stevens, C. and La Thangue, N. B., 2003. A New Role for E2F-1 in Checkpoint Control. *Cell Cycle* v. 2 p. 435–437.

11.8 DNA复制需要蛋白复合体的顺序组装

综述

Bell, S. P., and Dutta, A., 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* v. 71 p. 333–374.

Diffley, J. F., 2004. Regulation of early events in chromosome replication. *Curr. Biol.* v. 14 p. R778–R886.

Fangman, W. L., and Brewer, B. J., 1992. A question of time: replication origins of eukaryotic chromosomes. *Cell* v. 71 p. 363–366.

Forsburg, S. L., 2004. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 68 p. 109–131, table.

Gilbert, D. M., 2001. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* v. 294 p. 96–100.

Gilbert, D. M., 2002. Replication timing and transcriptional control: Beyond cause and effect. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 377–383.

Johnston, L. H., Masai, H., and Sugino, A., 1999. First the CDKs, now the DDKs. *Trends Cell Biol.* v. 9 p. 249–252.

Newlon, C. S., 1988. Yeast chromosome replication and segregation. *Microbiol. Rev.* v. 52 p. 568–601.

研究

Bell, S. P., Kobayashi, R., and Stillman, B., 1993. Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science* v. 262 p. 1844–1849.

Hardy, C. F., Dryga, O., Seematter, S., Pahl, P. M., and Sclafani, R. A., 1997. mcm5/cdc46-bob1 bypasses the requirement for the S phase activator Cdc7p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 94 p. 3151–3155.

11.9 有丝分裂由几种蛋白激酶协同完成

综述

Barr, F. A., Sillje, H. H., and Nigg, E. A., 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 429–440.

Blagden, S. P., and Glover, D. M., 2003. Polar expeditions—provisioning the centrosome for mitosis. *Nat. Cell Biol.* v. 5 p. 505–511.

Carmena, M., and Earnshaw, W. C., 2003. The cellular geography of aurora kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 4 p. 842–854.

Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A., 2004. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 14 p. 29–36.

Morgan, D. O., 1997. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 261–291.

Nigg, E. A., 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 21–32.

Nigg, E. A., 1993. Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 5 p. 187–193.

O'Connell, M. J., Krien, M. J., and Hunter, T., 2003. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.* v. 13 p. 221–228.

O'Farrell, P. H., 2001. Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol.* v. 11 p. 512–519.

研究

Chan, C. S., and Botstein, D., 1993. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* v. 135 p. 677–691.

Elia, A., Rellos, P., Haire, L., Chao, J., Ivins, F., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L., Smerdon, S., and Yaffe, M., 2003. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* v. 115 p. 83.

Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B. A., Gonzalez, C., Karess, R. E., Glover, D. M., and Sunkel, C. E., 1991. *polo* encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* v. 5 p. 2153–2165.

Osmani, A. H., McGuire, S. L., and Osmani, S. A., 1991. Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell* v. 67 p. 283–291.

Sillje, H. H., and Nigg, E. A., 2003. Signal transduction. Capturing polo kinase. *Science* v. 299 p. 1190–1191.

11.10 有丝分裂中发生许多形态学上的变化

综述

Carmena, M., and Earnshaw, W. C., 2003. The cellular geography of aurora kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 4 p. 842–854.

Engqvist-Goldstein, A. E., and Drubin, D. G., 2003. Actin assembly and endocytosis: From yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 19 p. 287–332.

Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A., 2004. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 14 p. 29–36.

Nigg, E. A., Blangy, A., and Lane, H. A., 1996. Dynamic changes in nuclear architecture dur-

ing mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp. Cell Res.* v. 229 p. 174–180.

研究

Heald, R., and McKeon, F., 1990. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* v. 61 p. 579–589.

Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N. J., Hope, T. J., Wahl, G. M., Hunter, T., and Fukunaga, R., 1998. PRC1: A human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol. Cell* v. 2 p. 877–885.

Lowe, M., Rabouille, C., Nakamura, N., Watson, R., Jackman, M., Jämsä, E., Rahman, D., Pappin, D. J., and Warren, G., 1998. Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* v. 94 p. 783–793.

Peter, M., et al., 1990. *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* v. 61 p. 591–602.

Uchiyama, K., Jokitalo, E., Lindman, M., Jackman, M., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., and Kondo, H., 2003. The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi disassembly-assembly during the cell cycle. *J. Cell Biol.* v. 161 p. 1067–1079.

11.11 有丝分裂染色体的浓缩和分离依赖凝聚蛋白和黏结蛋白

综述

Harper, J. W., Burton, J. L., and Solomon, M. J., 2002. The anaphase-promoting complex: It's not just for mitosis any more. *Genes Dev.* v. 16 p. 2179–2206.

Hirano, T., 1999. SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev.* v. 13 p. 11–19.

Hirano, T., 2005. Condensins: Organizing and segregating the genome. *Curr. Biol.* v. 15 p. R265–R275.

Nasmyth, K., and Haering, C. H., 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 74 p. 595–648.

Peters, J. M., 2002. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* v. 9 p. 931–943.

Pines, J., and Rieder, C. L., 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* v. 3 p. E3–E6.

研究

Ciosk, R., et al., 1998. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* v. 93 p. 1067–1076.

Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W., and Koshland, D., 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* v. 10 p. 3081–3093.

Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M., 1996. Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* v. 381 p. 438–441.

Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T., 1998. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* v. 282 p. 487–490.

Shirayama, M., et al., 1999. APC^{CDC20} promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* v. 402 p. 203–207.

Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., and Yanagida, M., 1999. Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev.* v. 13 p. 2271–2283.

Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K., 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* v. 400 p. 37–42.

Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., and Nasmyth, K., 2000. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* v. 103 p. 375–386.

Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J. M., 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* v. 103 p. 399–410.

11.12 完成有丝分裂不仅要求周期蛋白的水解

综述

Bardin, A. J., and Amon, A., 2001. Men and sin: what's the difference? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 815–826.

Ceulemans, H., and Bollen, M., 2004. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* v. 84 p. 1–39.

Farr, K. A., and Cohen-Fix, O., 1999. The metaphase to anaphase transition: A case of productive destruction. *Eur. J. Biochem.* v. 263 p. 14–19.

Janssens, V., and Goris, J., 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* v. 353 p. 417–439.

McCollum, D., and Gould, K. L., 2001. Timing is everything: Regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN. *Trends Cell Biol.* v. 11 p. 89–95.

Trautmann, S., and McCollum, D., 2002. Cell cycle: New functions for Cdc14 family phos-

phatases. *Curr. Biol.* v. 12 p. R733–R735.

研究

Champion, A., Jouannic, S., Guillon, S., Mockaitis, K., Krapp, A., Picaud, A., Simanis, V., Kreis, M., and Henry, Y., 2004. AtSGP1, AtSGP2 and MAP4K alpha are nucleolar plant proteins that can complement fission yeast mutants lacking a functional SIN pathway. *J. Cell Sci.* v. 117 p. 4265–4275.

Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M., and Doxsey, S., 2003. A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J. Cell Biol.* v. 161 p. 535–545.

Holloway, S. L., et al., 1993. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of MPF. *Cell* v. 73 p. 1393–1402.

Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H., and Nasmyth, K., 1991. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the S. cerevisiae transcription factor SWI5. *Cell* v. 66 p. 743–758.

Surana, U., Amon, A., Dowzer, C., McGrew, J., Byers, B., and Nasmyth, K., 1993. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* v. 12 p. 1969–1978.

Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A., 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol. Cell* v. 2 p. 709–718.

Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W., 1998. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* v. 282 p. 1721–1724.

11.13 检验点调控使不同细胞周期事件相协调

综述

Hartwell, L. H., and Weinert, T. A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* v. 246 p. 629–634.

研究

Weinert, T. A., and Hartwell, L. H., 1988. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *S. cerevisiae*. *Science* v. 241 p. 317–322.

11.14 DNA复制和DNA损伤检验点监控DNA代谢中的缺陷

综述

Bartek, J., and Lukas, J., 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 13 p. 738–747.

Bassing, C. H., and Alt, F. W., 2004. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* v. 3 p. 149–153.

Donzelli, M., and Draetta, G. F., 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* v. 4 p. 671–677.

Fei, P., and El-Deiry, W. S., 2003. P53 and radiation responses. *Oncogene* v. 22 p. 5774–5783.

Lavin, M. F., and Shiloh, Y., 1996. Ataxia-telangiectasia: A multifaceted genetic disorder associated with defective signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* v. 8 p. 459–464.

Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J., 2005. Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. *Chromosoma* p. 1–9.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J., 2004. Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* v. 3 p. 997–1007.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K., and Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* v. 73 p. 39–85.

Shiloh, Y., 2003. ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* v. 3 p. 155–168.

研究

Garvik, B., Carson, M., and Hartwell, L., 1995. Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* v. 15 p. 6128–6138.

O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A., and Goodship, J. A., 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* v. 33 p. 497–501.

Petrini, J. H., and Stracker, T. H., 2003. The cellular response to DNA double-strand breaks: Defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* v. 13 p. 458–462.

Sandell, L. L., and Zakian, V. A., 1993. Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* v. 75 p. 729–739.

Savitsky, K., Sfez, S., Tagle, D. A., Ziv, Y., Sartiel, A., Collins, F. S., Shiloh, Y., and Rotman, G., 1995. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.* v. 4 p. 2025–2032.

Tercero, J. A., Longhese, M. P., and Diffley, J. F., 2003. A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol. Cell* v. 11 p. 1323–1336.

Wright, J. A., Keegan, K. S., Herendeen, D. R., Bentley, N. J., Carr, A. M., Hoekstra, M. F.,

and Concannon, P., 1998. Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 95 p. 7445–7450.

Xu, Y., and Baltimore, D., 1996. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev.* v. 10 p. 2401–2410.

11.15 纺锤体装配检验点监控染色体—微管连接上的缺陷

综述

Kadura, S., and Sazer, S., 2005. SAC-ing mitotic errors: how the spindle assembly checkpoint (SAC) plays defense against chromosome missegregation. *Cell Motil. Cytoskeleton* v. 61 p. 145–160.

Millband, D. N., Campbell, L., and Hardwick, K. G., 2002. The awesome power of multiple model systems: Interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *Trends Cell Biol.* v. 12 p. 205–209.

Musacchio, A., and Hardwick, K. G., 2002. The spindle checkpoint: Structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 731–741.

Nicklas, R. B., 1997. How cells get the right chromosomes. *Science* v. 275 p. 632–637.

Rieder, C. L., and Salmon, E. D., 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* v. 8 p. 310–318.

Shannon, K. B., and Salmon, E. D., 2002. Chromosome dynamics: New light on Aurora B kinase function. *Curr. Biol.* v. 12 p. R458–R460.

研究

Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* v. 392 p. 300–303.

Dobles, M., Liberal, V., Scott, M. L., Benezra, R., and Sorger, P. K., 2000. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* v. 101 p. 635–645.

Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W., 1998. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* v. 12 p. 1871–1883.

Hoyt, M. A., Totis, L., and Roberts, B. T., 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* v. 66 p. 507–517.

Hwang, L. H., Lau, L. F., Smith, D. L., Mistrot, C. A., Hardwick, K. G., Hwang, E. S., Amon, A., and Murray, A. W., 1998. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* v. 279 p. 1041–1044.

Kim, S. H., Lin, D. P., Matsumoto, S., Kitazono, A., and Matsumoto, T., 1998. Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* v. 279 p. 1045–1047.

Li, R., and Murray, A. W., 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* v. 66 p. 519–531.

Li, X., and Nicklas, R. B., 1995. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* v. 373 p. 630–632.

Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V., and Benezra, R., 2001. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* v. 409 p. 355–359.

11.16 细胞周期失控导致癌症发生

研究

Hernando, E., et al., 2004. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* v. 430 p. 797–802.

Kinzel, B., Hall, J., Natt, F., Weiler, J., and Cohen, D., 2002. Downregulation of Hus1 by antisense oligonucleotides enhances the sensitivity of human lung carcinoma cells to cisplatin. *Cancer* v. 94 p. 1808–1814.

Weiss, R. S., Leder, P., and Vaziri, C., 2003. Critical role for mouse Hus1 in an S-phase DNA damage cell cycle checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* v. 23 p. 791–803.

11.17 展望

综述

Horak, C. E., and Snyder, M., 2002. Global analysis of gene expression in yeast. *Funct. Integr. Genomics* v. 2 p. 171–180.

Pagano, M., and Benmaamar, R., 2003. When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose. *Cancer Cell* v. 4 p. 251–256.

Specht, K. M. and Shokat, K. M., 2002. The emerging power of chemical genetics. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 155–159.

Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B., 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* v. 9 p. 3273–397.

Vodermaier, H. C., 2004. APC/C and SCF: Controlling each other and the cell cycle. *Curr. Biol.* v. 14 p. R787–R796.

Zhu, H., Bilgin, M., and Snyder, M. 2003. Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 783–812.

研究

Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* v. 425 p. 686–691.

Lustig, K. D., Stukenberg, P. T., McGarry, T. J., King, R. W., Cryns, V. L., Mead, P. E., Zon, L. I., Yuan, J., and Kirschner, M. W., 1997. Small pool expression screening: identification of genes involved in cell cycle control, apoptosis, and early development. *Methods Enzymol.* v. 283 p. 83–99.

McGarry, T. J., and Kirschner, M. W., 1998. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* v. 93 p. 1043–1053.

Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Li, P., Penkett, C. J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P., and Buhler, J., 2004. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat. Genet.* v. 36 p. 809–817.

桑建利　译

第12章　细胞凋亡

Douglas R. Green, Ph. D.
Chair, Department of Immunology St. Jude Children's Research Hospital
Memphis, TN

本章概要

12.1　导言

关键概念

- 程序性细胞死亡是在发育过程中存在的一种细胞死亡方式，它通常是以细胞凋亡的形式进行。
- 细胞凋亡也是一种细胞死亡模式，在其他的许多情况下发生，并且在机体正常的自我更新、抑制癌症以及其他病理过程中发挥作用。
- 很多动物细胞中存在许多分子，他们组成了信息转递通路，以凋亡的方式引起细胞死亡，并且这些信息传递通路可被恰当的刺激所活化。

在动物的发育过程中，一些细胞会死亡。在胚胎发育、变态发育以及组织转化过程中，不需要的细胞会被清除，这个过程被称为程序性细胞死亡（programmed cell death），程序性细胞死亡一般是以细胞凋亡（apoptosis）的机制发生的。例如，如图12.1所示，在脊椎动物肢体发育过程中，通过细胞死亡可以去除指（趾）间的蹼状结构（interdigital web），从而“雕刻”出手指和脚趾的形状。尽管大多数程序性细胞死亡都是通过细胞凋亡的方式进行的，但它们并不是一回事。程序性细胞死亡特指在发育过程中某一特定点上发生的细胞死亡，而凋亡特指的是细胞死亡的形态学特征。如图12.2所示，在凋亡过程中，经历死亡的细胞变得更为皱缩，质膜出泡（blebbing）、细胞核及细胞通常会裂解并且染色质发生凝集。最终，凋亡细胞会裂解成膜包裹的碎片并被周围细胞所吞噬。

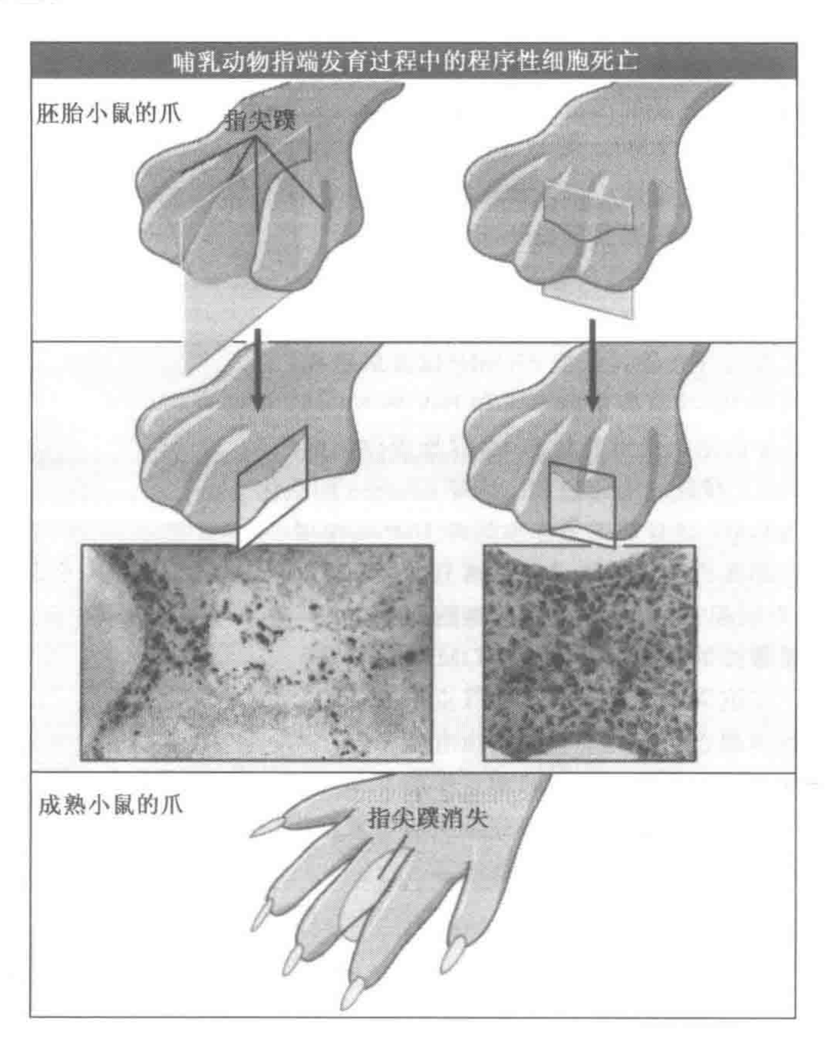


图12.1　指（趾）间蹼切片显示细胞死亡（细胞核深染）。这种细胞死亡具有细胞凋亡的特征。照片由Ceentre d' Immunologies的Pierre Golstein惠赠。复制自*Current Biology*，vol. 9，Chautan，M.，*et al.*，Interdigital cell death，pp. 967-970. Copyright 1999，获得Elsevier许可。

凋亡并不局限于发生在发育过程中由程序控制其死亡的细胞中。除了环境信号，还有一系列刺激因素可以引发细胞凋亡（图12.3），例如：必需生长因子的缺乏；糖皮质激素的刺激；γ-射线或化疗药物引起的DNA损伤；影响细胞骨架的药物；内质网功能障碍；热刺激、冷刺激以及作用于细胞的其他多种胁迫等。

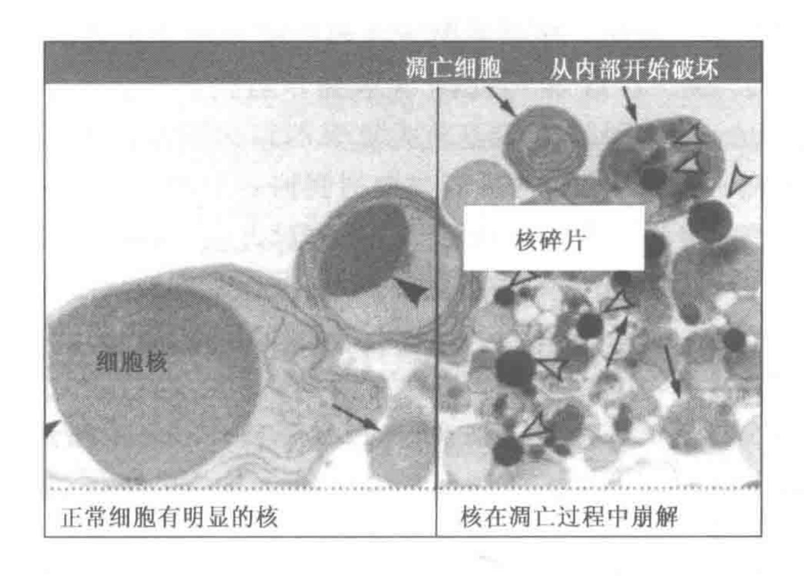


图 12.2 凋亡过程中细胞结构的变化。左边的图显示的是正常的细胞。右边的图显示的是凋亡细胞；三角箭头指示的是凝集的细胞核碎片。照片由 Osaka 大学医学院的 Shigekazu Nagata 惠赠。

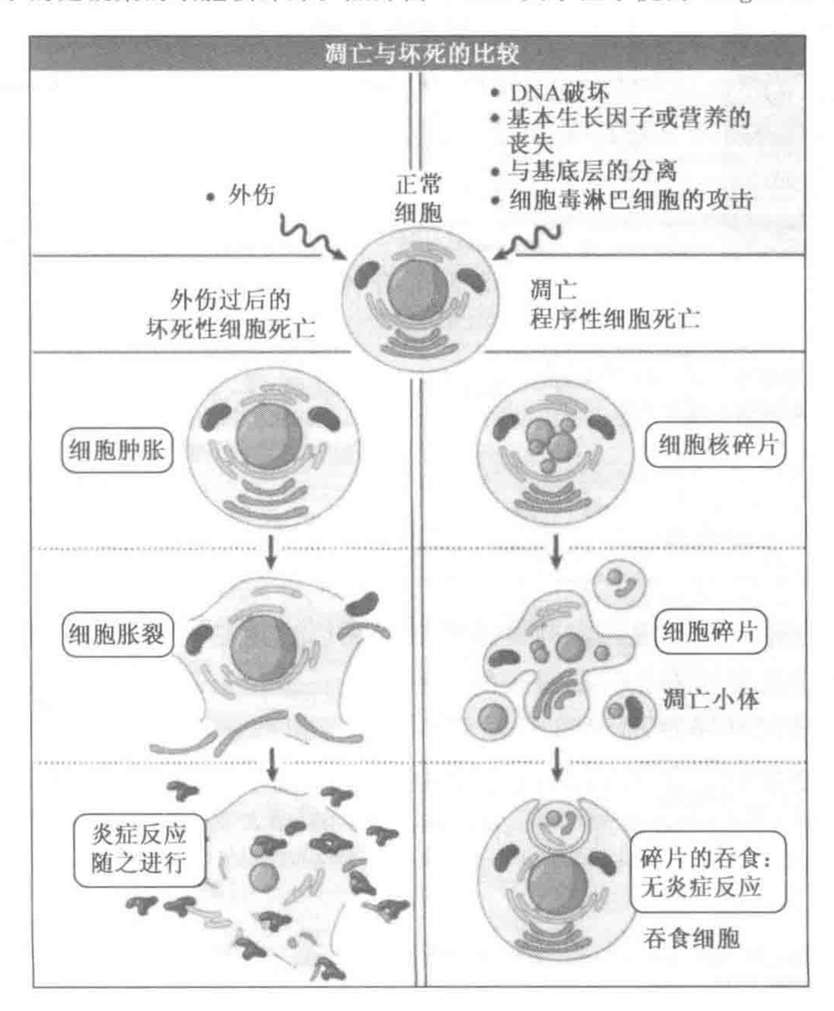


图 12.3 细胞损伤可导致坏死，坏死与凋亡的形态学特征不同，坏死细胞中，细胞器膨胀，细胞质膜裂解，但不发生染色质凝集。

其他方式导致的异常细胞也通过细胞凋亡被清除。贴壁细胞如果与它们所附着的基底物质相分离也以凋亡的方式死亡，这个过程称为失巢凋亡（homelessness）。在免疫系统中，细胞毒淋巴细胞会攻击靶细胞并启动这些靶细胞的凋亡通路。细胞凋亡也是清

除肿瘤细胞的重要机制。例如，抑癌基因 *p53* 具有引发凋亡的能力，这种能力是防御癌症的一种关键机制（见 13.11 具有 DNA 修复和维护作用的基因的突变会增加总突变率）。因此，细胞凋亡不仅对组织发育是至关重要的，并且对免疫防御和清除癌细胞也尤为重要。尽管如此，细胞凋亡必须受到精细的调控。凋亡不适宜的活化会对机体造成损伤，这可见于一些神经退行性疾病以及局部贫血对大脑、心脏和其他器官引发的后续损伤事件中。

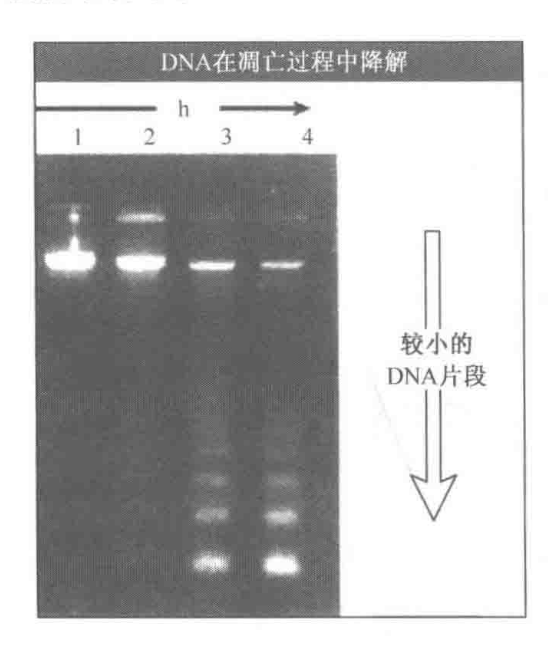


图 12.4 凋亡中的细胞会发生 DNA 片段化。照片由 Osaka 大学医学院的 Shigekazu Nagata 惠赠。

特别需要指出的是，并非所有的细胞死亡都是凋亡。例如，直接由局部贫血造成的细胞死亡则是细胞坏死（necrosis），通常，当细胞受到的损伤程度达到已无法使细胞存活时，就会发生细胞坏死。细胞凋亡与细胞坏死的形态学特征截然不同。如前所述，凋亡细胞皱缩，呈现特征性的质膜出泡，染色质凝集，裂解为膜包裹的碎片并被周围细胞所吞噬（见图 12.3）。如图 12.4 所示，凋亡细胞通常会出现的一个重要生化特征是 DNA 片段化，可呈现特征性的梯状条带（ladder）。与凋亡不同，坏死细胞通常会发生膨胀，且呈现染色质的凝集。坏死和凋亡的另一个重要区别（尤其是在脊椎动物中）在于坏死会引起炎症反应（inflammatory response），而凋亡则不会。正因如此，凋亡通常被视为“是安静的”。

细胞凋亡是动物细胞所具有的一个特征。很多动物细胞中存在许多分子，他们组成了信息传递通路，以凋亡的方式引起细胞死亡，并且这些信息传递通路可被恰当的刺激所活化。在其他有机体中是否存在细胞凋亡尚有争议。在很大程度上，脊椎动物、昆虫（主要是果蝇）以及线虫（秀丽新小杆线虫）细胞内凋亡的分子通路已被清楚地阐述。许多凋亡的关键执行者，尽管在具体角色和功能上存在很大的差别，但在进化上却是高度保守的。

在本章中，我们将阐述细胞凋亡的主要效应者和抑制因子。接着，将讨论凋亡效应者的活化通路。细胞凋亡的遗传学机理将在对秀丽新小杆线虫和果蝇研究这一节中阐述，最后，我们将讨论细胞吞噬（phagocytosis）对死亡细胞的清除作用以及细胞凋亡在疾病中的作用。

12.2 Caspases 通过裂解特异性底物调控细胞凋亡

关键概念

- Caspases 蛋白酶分为三种类型：起始 caspases，效应 caspases 以及炎症相关的 caspases。其中，前两种在细胞凋亡中发挥作用。
- 凋亡细胞的形态学及生化特征是由效应 caspases 作用于它们的底物而引起的。
- 已鉴定出许多 caspases 的底物，并且在一些情况下，这些底物的裂解对细胞所产生的影响已经为我们所知。

胱天蛋白酶（caspases）调控凋亡细胞中许多细胞以及生化水平的变化。在大多数动物细胞中，caspases 是以无活性的酶原（zymogen）形式存在的，在激活细胞凋亡时，它们不需要重新合成。如图 12.5 所示，依据功能的不同，caspases 主要分为三种类型：起始 caspases，效应 caspases 和炎症相关 caspases。效应 caspases（在脊椎动物中主要是 caspases-3 和 caspases-7）负责裂解多种不同的蛋白质底物从而影响细胞凋亡。通常情况下，这些 caspases 会在以下位点裂解底物：Asp-Xaa-Xaa-Asp/Gly、Asp-Xaa-Xaa-Asp/Ser 或 Asp-Xaa-Xaa-Asp/Asp（“/”表示裂解位点，Xaa 代表任何氨基酸）。据估计，在哺乳动物细胞中，大约有 500 种 caspases 的底物，尽管大多数的底物因裂解而产生的效应还是未知的。在一些情况下，这些裂解事件在细胞凋亡过程中具有特定的作用，并使细胞产生与凋亡相关的变化，而其他的则可能是无关的“旁观”裂解事件。

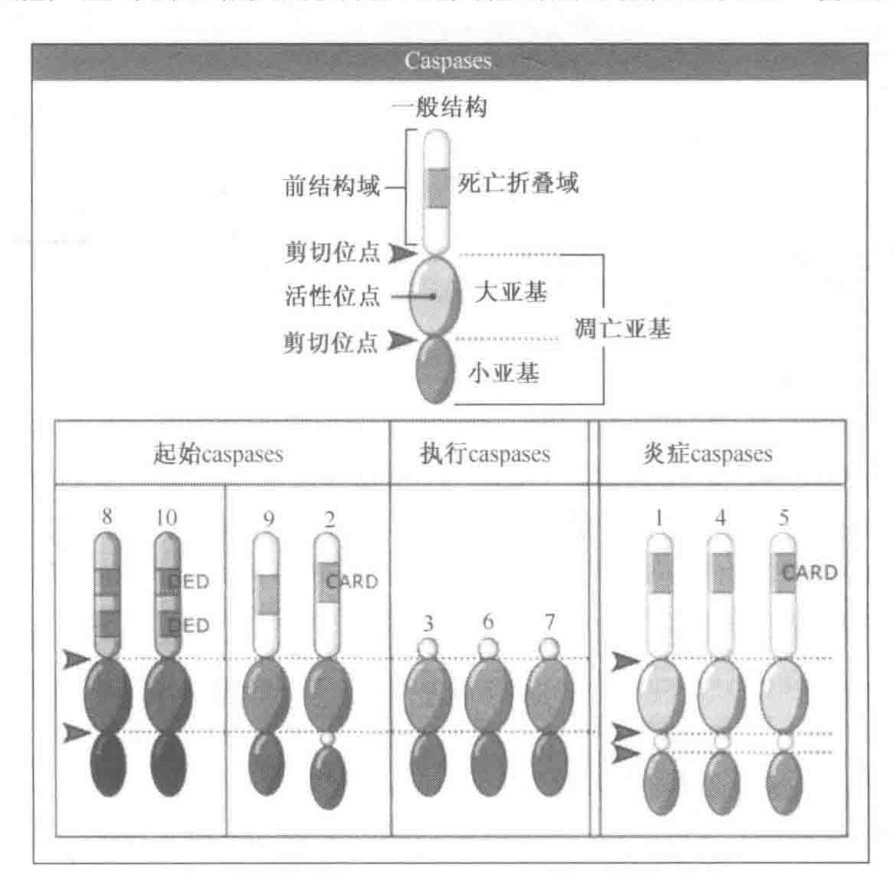


图 12.5　以图表形式显示脊椎动物细胞中不同类型的 caspases。注意起始 caspases 和炎症相关 caspases 上的前结构域（prodomain）以及蛋白质-蛋白质相互作用的区域。死亡效应结构域（death effector domain，DED）；caspases 募集结构域（caspases recruitment domain，CARD）。

凋亡过程中 DNA 的片段化就是由 caspases 介导的。在细胞中，依赖于 caspases 的 DNase（CAD）与其抑制剂 iCAD 一起以复合体的形式存在。事实上，CAD 必须被 iCAD 包装入这个复合体才具有潜在的活性，而这种活性只有当 iCAD 被效应 caspases 裂解后才能显现出来。活化的 CAD 会在核小体之间的可接近的位点酶解 DNA 分子，导致 DNA 断裂并形成特征性的梯状条带（ladder）。缺乏 CAD 或 iCAD 的细胞在凋亡过程中不会显示出特征性的梯状条带。

肌球蛋白轻链激酶 ROCK-1 是效应 caspases 的一个底物，但 caspases 的裂解作用却激活了该激酶的活性。凝溶胶蛋白（gelsolin）也以相似的方式被 caspases 裂解并活

化。这两种酶的活化可以引起细胞骨架的变化，从而使凋亡细胞产生出特征性的质膜出泡现象（细胞骨架调控的细节见 8.10 加帽蛋白调控肌动蛋白丝的长度）。

尽管 caspases 对底物的裂解可能都参与了凋亡特征的形成，但没有任何一种底物或底物的聚合物显示出会对细胞死亡负责。caspases 最终导致细胞死亡可能是由于许多不同的底物裂解事件作用的结果，而且到目前为止，我们还不能通过调节任何已知的特异底物集合来有效地抑制由 caspases 引起的细胞死亡。这要么是因为有很多的底物作用于细胞凋亡（这似乎是可能的），要么是因为我们还没有发现那些最为重要的底物。尽管如此，caspases 的抑制药物，包括 VAD-fmk（valine-alanine-aspartate-fluoromethylketone）能够抑制细胞及生化水平的变化，在一些情况下，甚至能够抑制细胞死亡（但也不都是如此；见 12.15 MOMP 可引起 caspase 非依赖的细胞死亡）。

12.3 效应 caspases 通过裂解而被活化，起始 caspases 通过二聚化而被活化

关键概念

- 在特定位点对效应 caspases 裂解是其活化的必要和充分条件。
- 这一裂解作用通常是由起始 caspases 介导的。
- 起始 caspases 被含有 death fold 蛋白质-蛋白质相互作用结构域的接头分子所活化。

在哺乳动物中，效应 caspases（caspases-3、caspases-7 和 caspases-6）酶原（zymogen）前体以无活性的二聚体（dimmer）形式预先存在于细胞中。在大亚基（含有组成活性部位的半胱氨酸-组氨酸二聚体）和小亚基（含有决定其催化特异性的区域）之间特异的天冬氨酸位点裂解酶原可以使其活化，并成为成熟的、有活性的效应 caspases。酶原的裂解使得蛋白酶催化活性所必需的半胱氨酸-组氨酸二聚体与瞬时结合底物的区域相接近。在裂解中，caspases 小亚基上特定的 Arg 负责与底物中的 Asp 结合，在图 12.6 中，用“R”表示这个 Arg。因此，效应 caspases 酶原的裂解使活性部位得以形成，从而成为成熟的、活化的效应 caspases。

可以裂解并激活效应 caspases 的一种蛋白酶是粒酶 B（granzyme B），它存在于细胞毒淋巴细胞（细胞毒 T 细胞和自然杀伤细胞）的溶胞颗粒（granule）中。当细胞毒淋巴细胞锁定某一靶细胞时（如被病毒感染的细胞），就会释放粒酶 B 到靶细胞的细胞质（cytoplasm）中。粒酶 B 可以直接活化靶细胞中的效应 caspases 从而导致细胞凋亡。尽管如此，这并不是粒酶 B 杀伤细胞的唯一方式（见 12.14 细胞凋亡的死亡受体通路通过裂解只含有 BH3 结构域的 Bid 蛋白引起 MOMP）。

与之相似，在细胞凋亡过程中，活化的 caspases-3 和 caspases-7 可以通过裂解 caspases-6 从而使其活化。这就提出一个问题：caspases-3 和 caspases-7 在通常情况下是如何被活化的呢？在大多数时候，这些效应 caspases 的裂解是通过起始 caspases 所介导的。正是这些由起始 caspases 激活的效应 caspases 确定了不同的凋亡通路，并使这些不同的凋亡通路相协调。

与效应 caspases 不同，起始 caspases（在哺乳动物中是 caspases-2，-8，-9 和-10）在细胞中是以无活性的单体（monomer）形式预先存在的。裂解这些单体并不能在这些

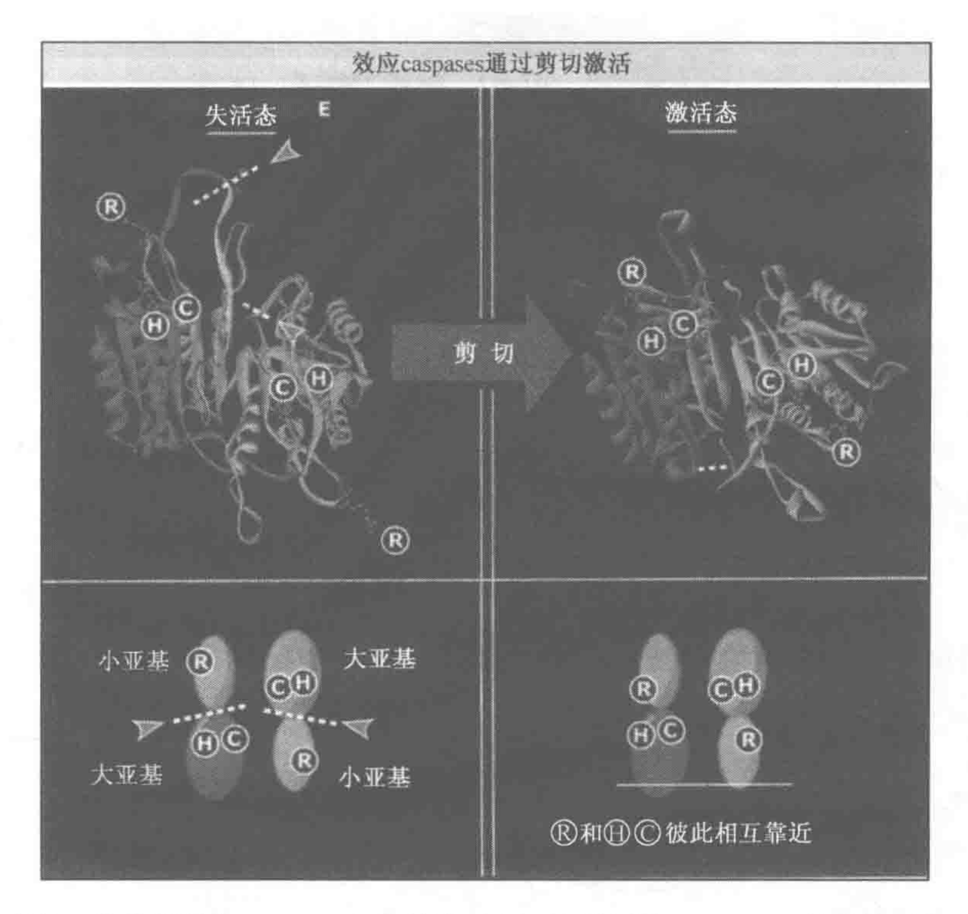


图 12.6 上图显示的是裂解前 caspases-7 的结构（左）和裂解后 caspases-7 的结构（右），这个裂解使 caspases-7 活化。C（半胱氨酸）和 H（组氨酸）显示的是催化二联体（catalytic dyad），R（精氨酸）是特异性的决定位点，与底物的天冬氨酸结合。注意，caspases-7 的裂解导致 R 的移位，使之与催化二联体相比邻。下图是效应 caspases 的活化示意图，显示效应 caspases 的裂解是如何使活性部位得以形成的。结构来自 Protein Data Bank files 1GQF 及 1I51。

蛋白酶上形成活性部位，但是，当两个起始 caspases 单体被迫形成二聚体时则可以通过相互作用产生活性部位从而使之被活化，见图 12.7。当二聚体一旦形成后，随后发生的在分子内部 Asp 处的裂解可以稳定已形成的二聚体结构。这种通过二聚化来活化的机制被称为诱导临近（induced proximity）。

起始 caspases 具有大的前结构域（prodomain），这种前结构域上有蛋白质-蛋白质相互作用的区域（protein-protein interaction motif）（见图 12.5 和图 12.7），比如 caspases 募集结构域（CARD）、死亡效应结构域（DED）和 pyrin 区（PYR）（在哺乳动物起始 caspases 的前结构域上没有发现 pyrin 区，而在鱼类的一种起始 caspases 上发现了 pyrin 区，在其他的一些蛋白质上也发现了这种结构域）。所有这些区域在结构上都是相关的，它们被统称为死亡折叠域（death fold），见图 12.8。某一特定起始 caspases 的前结构域与一个特定的接头分子（adaptor molecule）相互作用可以界定一条凋亡通路。这种相互作用倾向于以 like-like manner 的方式进行的（例如 CARD-CARD 相互作用、DED-DED 相互作用）。已经有两条这样的凋亡通路得到了详细的阐述，它们分别是死亡受体通路（death receptor pathway）和线粒体通路（mitochondrial pathway）（见图 12.7 和 12.6 细胞凋亡的死亡受体通路呈递外部信号，以及 12.8 细胞凋亡的线粒体通路）。

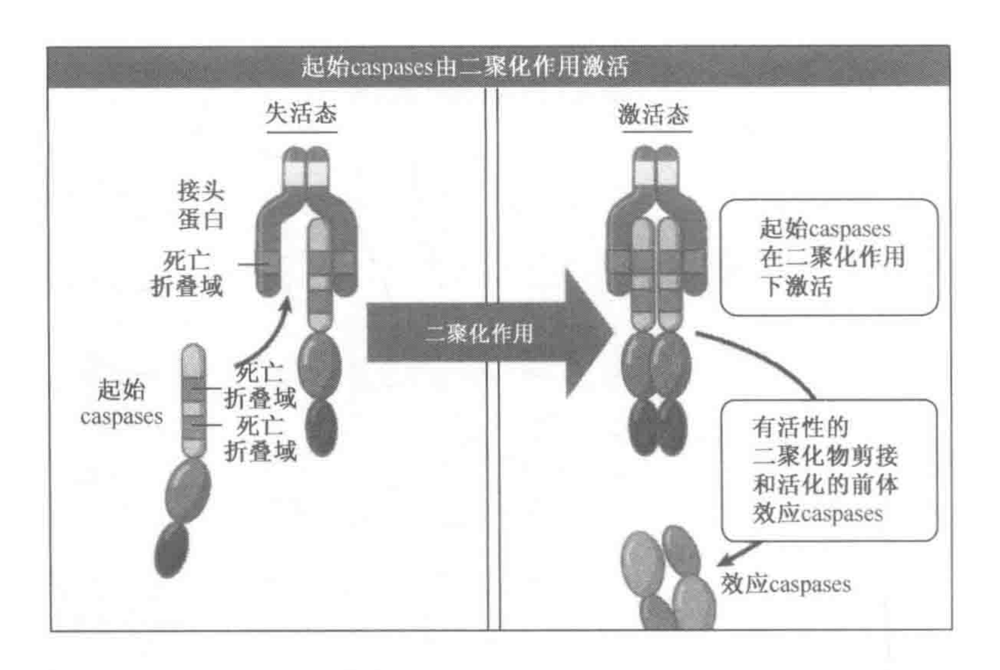


图 12.7 当接头分子与起始 caspases 相结合并迫使它们形成二聚体时（诱导临近），蛋白酶的活性部位得以形成，起始 caspases 被活化。活化的起始 caspases 可以裂解并激活效应 caspases。

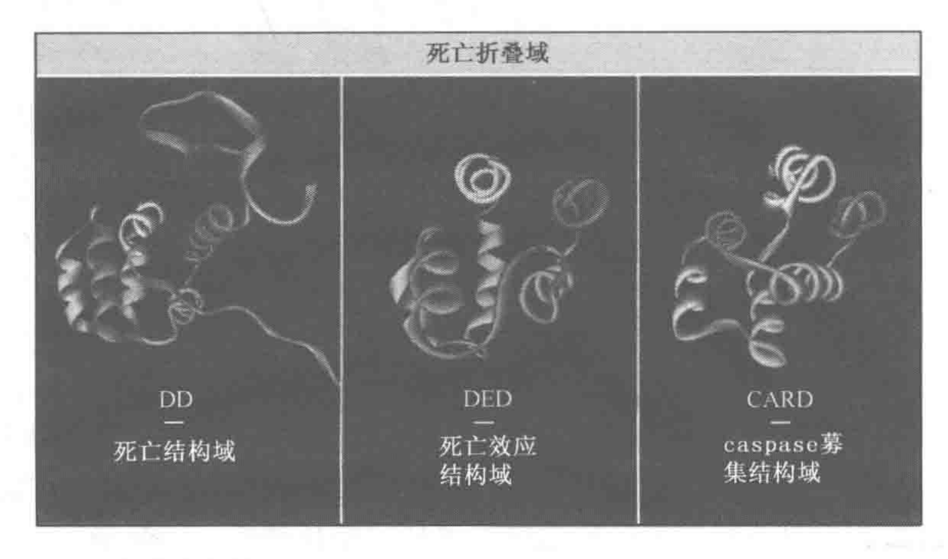


图 12.8 死亡效应子结构域（death effector domain，DED）、caspases 募集结构域（caspases recruitment domain，CARD）、死亡结构域（death domain，DD）以及 pyrin 区（pyrin domain，PYD）在结构上都很相似。这些结构域被统称为“death fold”。deathfold 作为蛋白质-蛋白质相互作用区域发挥作用，并倾向于与其他分子上的相关区域相互作用。结构来自 Protein Data Bank files 1DDF、1E41 及 1CY5。

12.4 一些凋亡蛋白抑制因子（IAP）对 caspases 的阻抑作用

关键概念

- 凋亡蛋白抑制因子是由多种具不同功能的蛋白质组成的家族；其中一些抑制因子可以结合并抑制 caspases，并通过蛋白酶体（proteasome）的作用，诱导 caspases 的降解。
- 既然效应 caspases 可通过裂解而被活化，而这些 caspases 又可以互相裂解并活化对方，所以在细胞中，任何 caspases 的蛋白水解酶活力都能被迅速放大，进而导致细胞凋亡。因此，存在一定的机制来限制没有接受死亡信号的细胞中的 caspases 的潜在的“意外”活化极为重要。

第一个凋亡蛋白抑制因子（IAP）是在一种昆虫杆状病毒（baculovirus）中被发现的，其功能是阻止被感染的细胞发生凋亡（这一观点认为，病毒可以编码抑制凋亡的蛋白质，针对这一观点，本章的后续部分将做详细阐述）。随后，通过序列同源性在其他生物，包括哺乳动物体内鉴定出了多种 IAP 分子。很多 IAP 分子尽管在结构域的组成上与已知的 IAP 分子高度同源，并被命名为 IAP，但它们具有的一些功能与调控细胞凋亡无关。尽管如此，有一些 IAP 分子，包括在哺乳动物体内发现的 X 连锁凋亡抑制因子（X-linked IAP，XIAP），是 caspases 的有效抑制因子，尤其可有效抑制起始 caspases-9 和效应 caspases-3，-7 的活性。图 12.9 显示的是结合到 caspases-3 上的 XIAP 的结构（IAP 的细节见 12.18 昆虫细胞的凋亡与哺乳动物和线虫有所不同）。

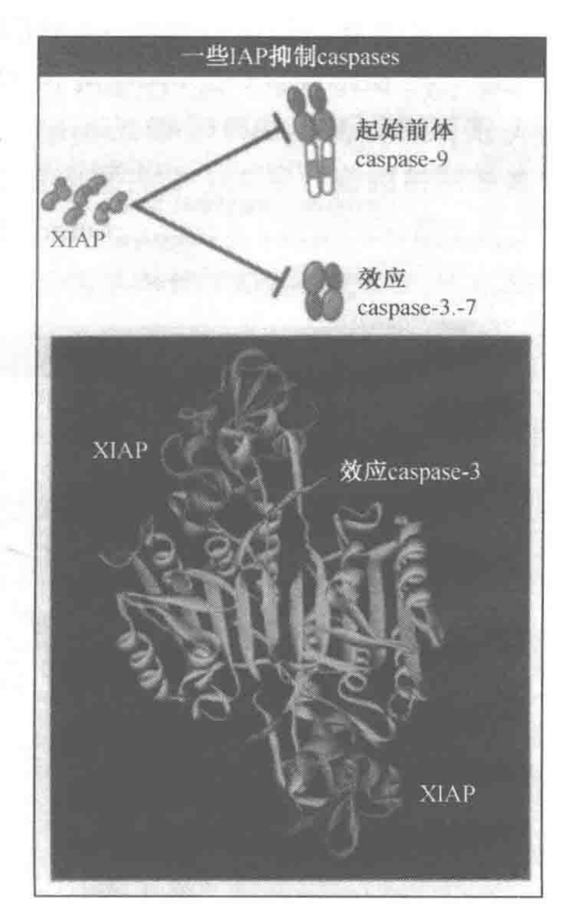


图 12.9　XIAP 结合并抑制 caspases-9，-3 和-7 的活性。图中显示 caspases-3 与 XIAP 相互作用区域的结构。结构来自 Protein Data Bank files 1I30。

IAP 拥有杆状病毒 IAP 重复序列（baculovirus IAP repeat，BIR），而且还通常拥有特征性的指环结构域（RING finger）。那些具有指环结构域的 IAP，包括 XIAP，也能像泛素 E-3 连接酶那样发挥作用，XIAP 能有效地靶向自身以及其底物 caspases，进而引发泛素化过程及被蛋白酶体（proteasome）降解。因此，一种 caspases 的活化并不一定会导致细胞凋亡，只要 IAP 能抑制并最终降解此 caspases。

尽管 XIAP 可以有效地抑制 caspases 的活性，但是缺乏这种 IAP 却发育正常，并不明显地显现出与细胞凋亡有关的任何异常。因此，XIAP 在调控细胞凋亡上的重要性（以及对 XIAP 这个分子进行调控所起的作用）尚不清楚。

12.5　一些 caspases 在炎症反应中发挥作用

关键概念

- 除了起始 caspases 和效应 caspases 以外，caspases 家族另外一系列蛋白酶的作用是加工（process）细胞因子而不是调控细胞凋亡。

有一些 caspases 在大多数的凋亡过程中并不具有重要功能，但却在炎症反应中发挥了至关重要的作用。事实上，第一个被发现的 caspase 并不是作为凋亡的调控因子被鉴定出来，而是作为加工、分泌白细胞介素-1β（interleukin-1β）所必需的一种蛋白质。这个蛋白酶就是 caspases-1，它最初被称为白细胞介素-1β 转化酶（interleu- kin-1β converting enzyme，ICE）。此外，caspases-1 也是加工和分泌白细胞介素-18 所必需的。

图 12.10 显示的是 caspases-1 的活化需要一个复合体的形成，而这个复合体还包括了另外一种 caspases（在人体中是 caspases-5，在啮齿动物中是 caspases-11）以及两个接头分子：NALP、ASC。缺乏 caspases-1、caspases-11 或 ASC 的小鼠不能分泌白细胞介素-1 或白细胞介素-18，但并未表现出发育或凋亡缺陷。相比之下，如果人的 NALP-1 发生了活化突变（activating mutation），则会出现与细胞因子分泌增强相关的炎症综合征。

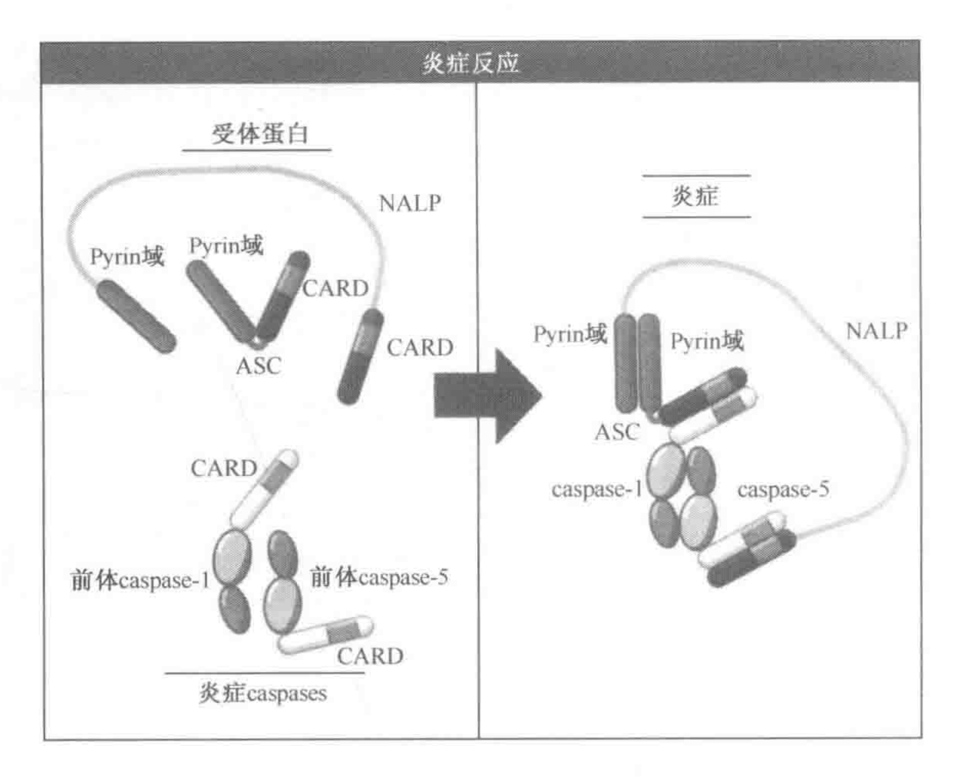


图 12.10 加工、分泌白细胞介素-1β 和白细胞介素-18 所必需的 caspase-1 是被一个复合体所活化的，这个复合体包括另外一种 caspases（caspases-5）以及两个接头分子（ASC 和 NALP）。这些蛋白质通过蛋白质-蛋白质相互作用区结合。一些不同的炎性体（inflammasome）已经得到了描述，它们通过与上述模型相似的方式被活化。

其他两个基因的定位与 caspases-1 和 caspases-5 的接近并且与该 caspases 亚家族具有序列同源性的 caspases 是 caspases-4 and -12。caspases-4 的功能现在还不清楚。有趣的是，大多数人都由于一种过早停止密码（premature stop codon）而缺乏 caspases-12 的表达，但是在大约 10%的非洲后裔中，caspases-12 基因可以被通读并表达出来的。caspases-12 在人体内的功能目前还不清楚。

12.6 细胞凋亡的死亡受体通路呈递外部信号

关键概念

- 有两条细胞凋亡通路得到了详细的描述，它们分别是死亡受体通路（death receptor pathway），也称为外部通路（extrinsic pathway）以及线粒体通路（mitochondrial pathway），也称为内部通路（intrinsic pathway）。
- 属于肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）家族的特异性配体（ligand）与其受体（死亡受体）结合可以引起 caspases 的活化以及细胞凋亡。

在脊椎动物细胞中，caspases 的活化是由不同的凋亡通路引起的。有两条通路得到了详细的描述，它们分别是死亡受体通路（death receptor pathway），也称为外部通路（extrinsic pathway）以及线粒体通路（mitochondrial pathway），也称为内部通路（intrinsic pathway），见图 12.11。尽管这两条通路在很多重要的方面不同，但它们也有相似之处。在每条通路中，起始 caspases 都通过诱导临近方式被活化，并进而导致效应 caspases 的活化。此外，这两条凋亡通路间还存在“交叉调控”（crosstalk），死亡受体

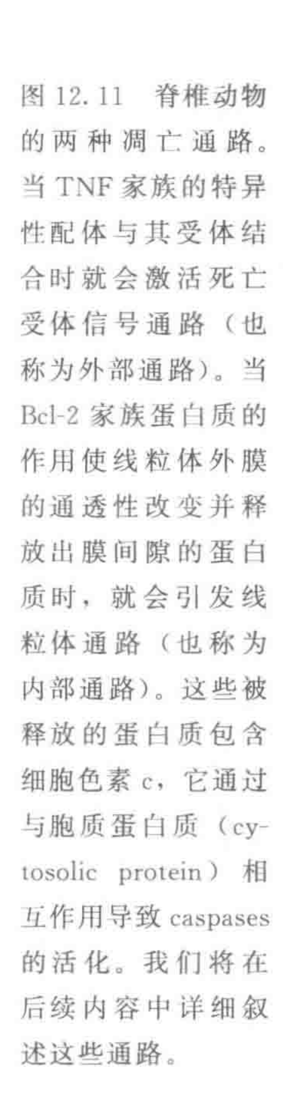


图 12.11　脊椎动物的两种凋亡通路。当 TNF 家族的特异性配体与其受体结合时就会激活死亡受体信号通路（也称为外部通路）。当 Bcl-2 家族蛋白质的作用使线粒体外膜的通透性改变并释放出膜间隙的蛋白质时，就会引发线粒体通路（也称为内部通路）。这些被释放的蛋白质包含细胞色素 c，它通过与胞质蛋白质（cytosolic protein）相互作用导致 caspases 的活化。我们将在后续内容中详细叙述这些通路。

通路也有线粒体通路的参与。

在脊椎动物中死亡受体是肿瘤坏死因子受体（tumor necrosis factor receptor，TNFR）家族的一个亚家族，包括 TNFR1、Fas（也被称为 CD95 或 APO-1）以及 TRAIL 受体（在人体内是 TRAIL-R1 和-R2，也被称为 DR4 和 DR5）。图 12.12 显示出不同类型的死亡受体。特异性配体（TNF、Fas 配体或 TRAIL）能够分别结合到这些相应受体的三聚体形式上，从而很快引发细胞凋亡。这些配体通常是由一系列不同类型的细胞，包括免疫系统的细胞，在对炎症刺激做出反应时产生的。

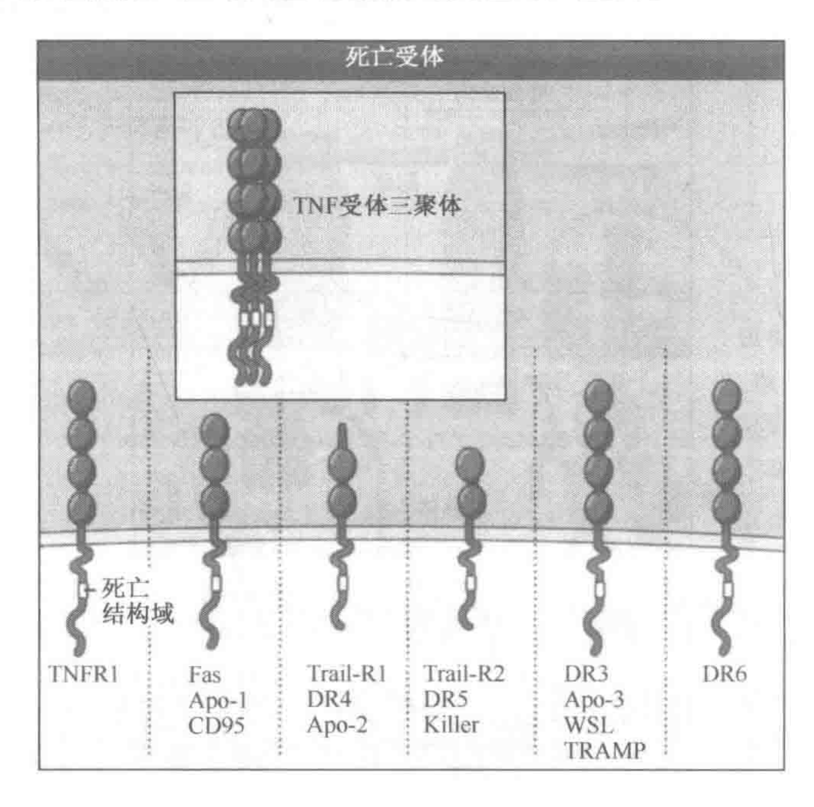


图 12.12　死亡受体是 TNF 受体家族的成员，这些受体的胞内部分具有死亡结构域。在脊椎动物的很多类型的细胞中，这些受体以三聚体的形式存在于细胞表面。

死亡受体的胞内部分都有一个死亡结构域，（见图 12.8 和图 12.12）。同 caspases 募集结构域（CARD）、死亡效应结构域（DED）和 pyrin 区（PYR）一样，死亡结构域也是一种 death fold，死亡受体上的死亡结构域和接头分子上的死亡结构域能够相互作用（death fold 的细节见 12.3 效应 caspases 通过裂解而被活化，起始 caspases 通过二聚化而被活化）。

在细胞表面，死亡受体以三聚体（trimer）的形式存在，而配体可能是以簇（cluster）的形式与受体结合从而将两个或更多的受体三聚体交联（crosslink）在一起。这一簇集方式暴露出死亡结构域，使其可与细胞内的蛋白质相互作用。Fas/CD95 和 TRAIL 受体上的死亡结构域在交联后通过与接头蛋白 FADD（Fas-associated death domain）上的死亡结构域相互作用从而结合到 FADD 上，这使得细胞内的 FADD 分子聚集在一起，同时也暴露出 FADD 分子中含死亡效应结构域（DED）的区域。

接头蛋白 FADD 上的 DED 随即可与 caspases-8 单体（monomer）前结构域上的 DED 结合，从而使 caspases-8 二聚化并通过诱导临近效应活化起始 caspases。发生交联的死亡受体、接头蛋白 FADD 以及 caspases-8 组成了死亡诱导信号复合体（death-indu-

cing signaling complex，DISC）。活化的 caspases-8 又可以去裂解并活化细胞中底物分子，包括效应 caspases-3 和-7，从而导致细胞凋亡。图 12.13 总结了死亡受体信号通路。

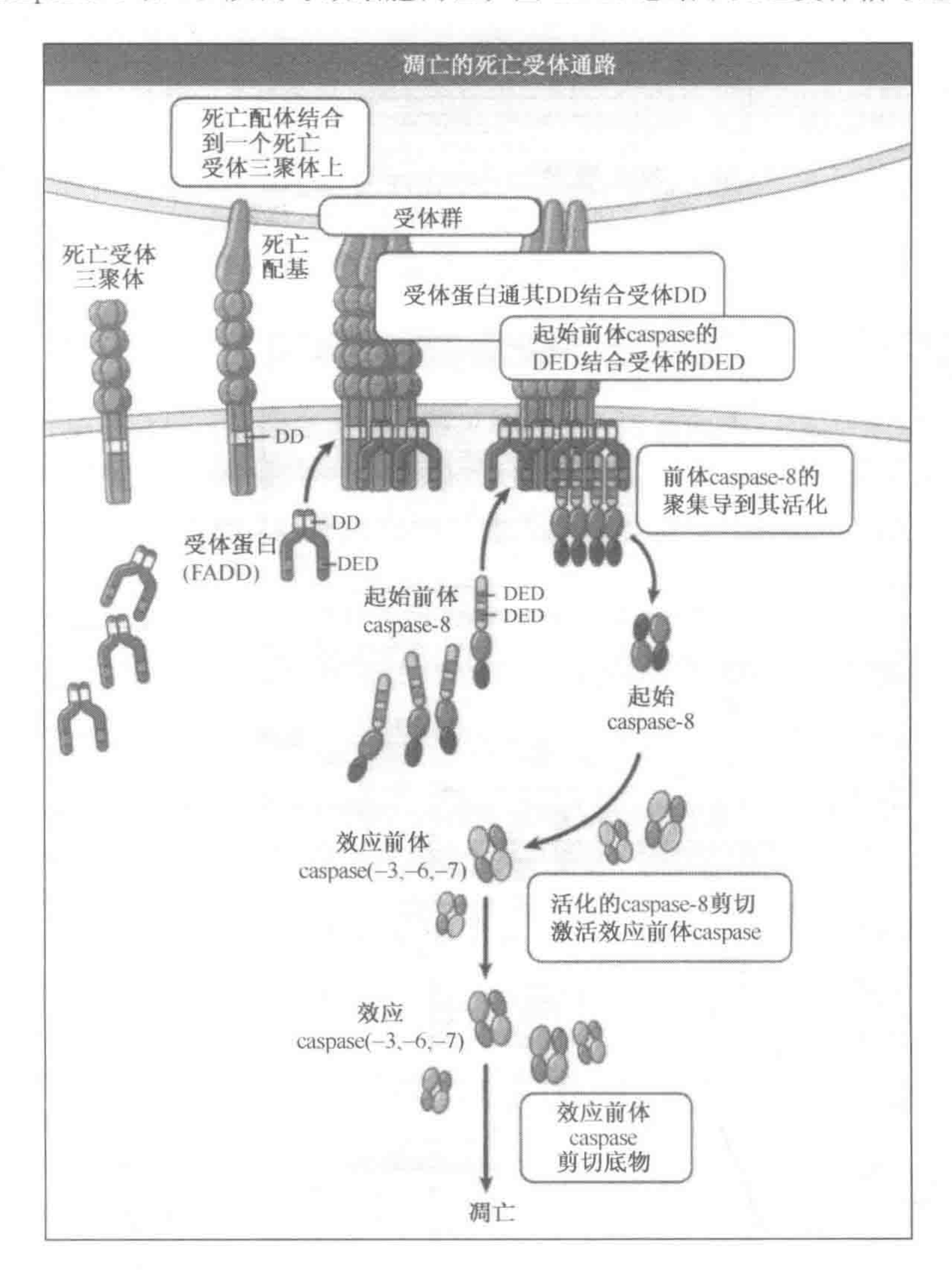


图 12.13　死亡受体的交联使得接头分子 FADD 通过死亡结构域（DD）的相互作用被募集到死亡受体的胞内区。接着，caspases-8 通过死亡效应结构域（DED）的相互作用结合到 FADD 上。二聚化的 caspases-8 通过诱导临近效应使自身活化。活化的 caspases-8 又可以去裂解并活化效应 caspases，从而导致细胞凋亡。由死亡受体、FADD 和 caspases-8 组成的复合体称为死亡诱导信号复合体（DISC）。

人们对死亡受体介导的细胞凋亡的很多功能，尤其是在免疫效应机制和免疫调控上的功能进行了描述。人们在许多类型的细胞中，包括神经元（neuron）细胞中，还阐明了该凋亡通路的其他功能。基于 TRAIL 能在一些肿瘤细胞中引发细胞凋亡，人们将 TRAIL 作为一种癌症治疗手段，目前正对其进行深入研究。

与 Fas 在免疫系统中的功能相一致，Fas 或其配体发生突变的人或小鼠会患有一种疾病，即由于异常 T 细胞群落的积累而造成淋巴器官（lymphoid organ）的大量增生。这些突变个体也会出现 B 淋巴细胞异常，包括产生自身免疫抗体以及 B 细胞淋巴瘤的形成。

12.7 TNFR1 介导的凋亡信号具有复杂性

关键概念

- 肿瘤坏死因子（TNF）与其受体 TNFR1 的结合既可以诱导凋亡信号，也可以引起抗凋亡信号。

与其他死亡受体不同的是，TNFR1 的死亡结构域不与接头分子 FADD 结合。如图 12.14 所示，发生交联的 TNFR1 会募集另一种接头分子——TNF 受体相关的死亡区蛋

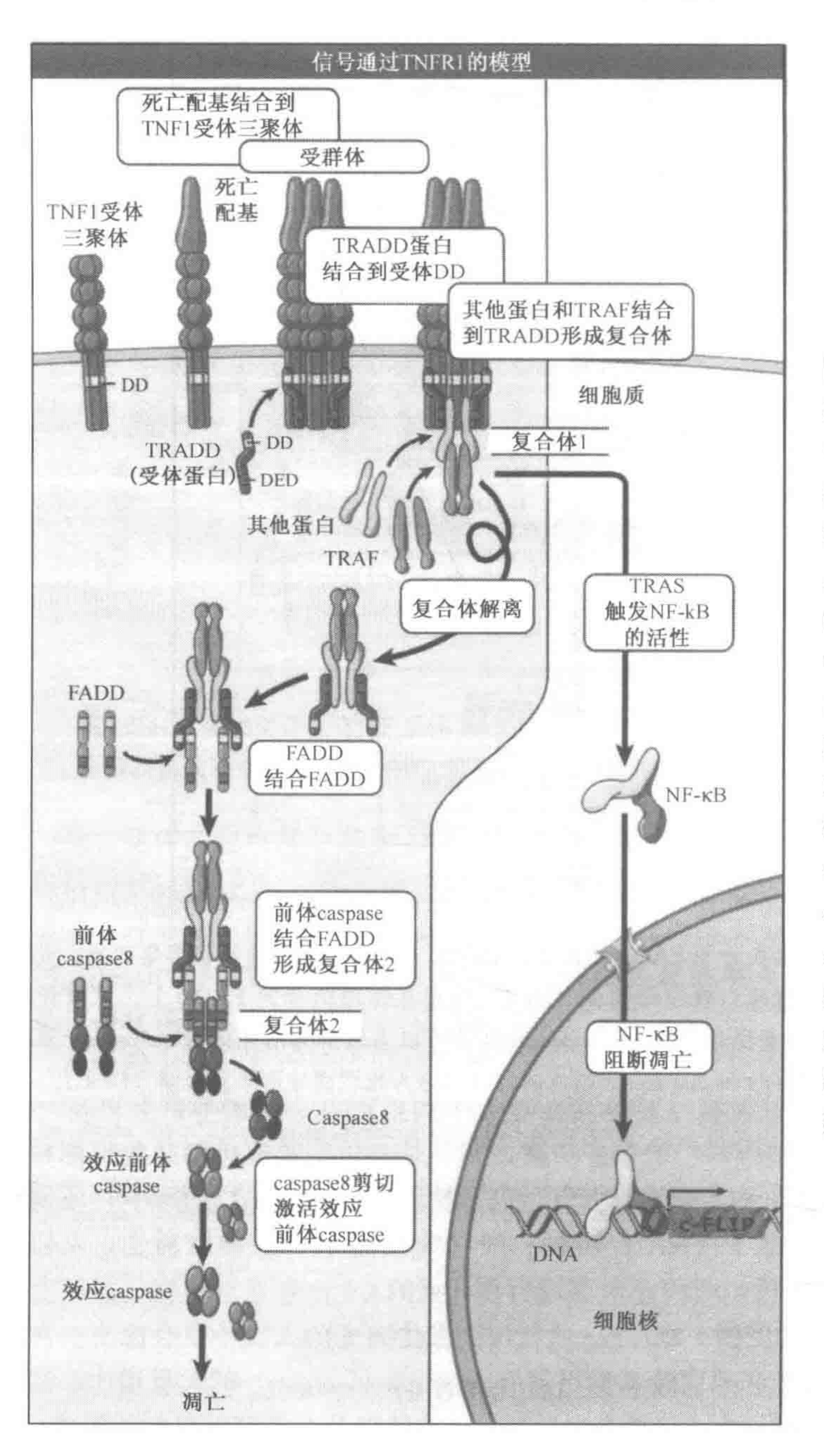


图 12.14 TNF 与 TNFR1 结合可以引起 NF-κB 的活化，抑制凋亡及 caspases 的活化。TNFR1 的交联导致一种复合体（ComplexⅠ）的形成，这种复合体包括了受体的胞内部分、接头分子（TRADD）以及其他一些蛋白质。这个复合体可以解离，并在胞质中与接头分子 FADD 结合，而 FADD 又可结合并活化 caspases-8（Complex Ⅱ）。活化的 caspases-8 能裂解并活化效应 caspases 从而引起细胞凋亡。然而，NF-κB 的活化又能够产生抗凋亡的分子，从而抑制 caspases 的活化以及细胞死亡。

白（TNF recepor-associated death domain，TRADD）。随后，TRADD 以二聚体的形式从胞内 TNFR 处释放，接着，在细胞质中，二聚化的 TRADD 会与 FADD 结合。而二聚化的 FADD 随即可以结合并活化起始 caspases-8。

发生交联的 TNFR1 也会募集其他分子结合到其胞内区域，比如 TRAF（TNF recepor-associated factor）。TRAF 可以活化细胞核因子-κB（NF-κB），NF-κB 是一种转录因子。NF-κB 调控的蛋白质可以抑制 DISC 的形成以及 caspases-8 的活化。

因此，TNF 会引起 TNFR1 的交联，而发生交联的 TNFR1 既可以产生抑制凋亡的信号，也可以产生促进凋亡的信号。如果 NF-κB 被活化，TNF 则不能引起细胞凋亡，而是去参与炎症反应。相反，如果 NF-κB 被抑制，或者 RNA、蛋白质的合成被抑制，TNF 则可引发细胞凋亡。

在 NF-κB 被活化后，细胞所表达一种重要的蛋白质被称为 c-FLIP（cellular FADD-like interleukin-1β converting enzyme inhibiting protein），有趣的是，该蛋白质与 caspases-8 密切相关，但它却缺少蛋白酶活性所必需的元件（包括活性部位 Cys）。图 12.15 显示，c-FLIP 也有两个 DED 结构域，因而它可与 caspases-8 竞争结合接头分子 FADD，从而阻止 caspases-8 的活化。理所当然，c-FLIP 也能够抑制由其他死亡受体引起的细胞凋亡。

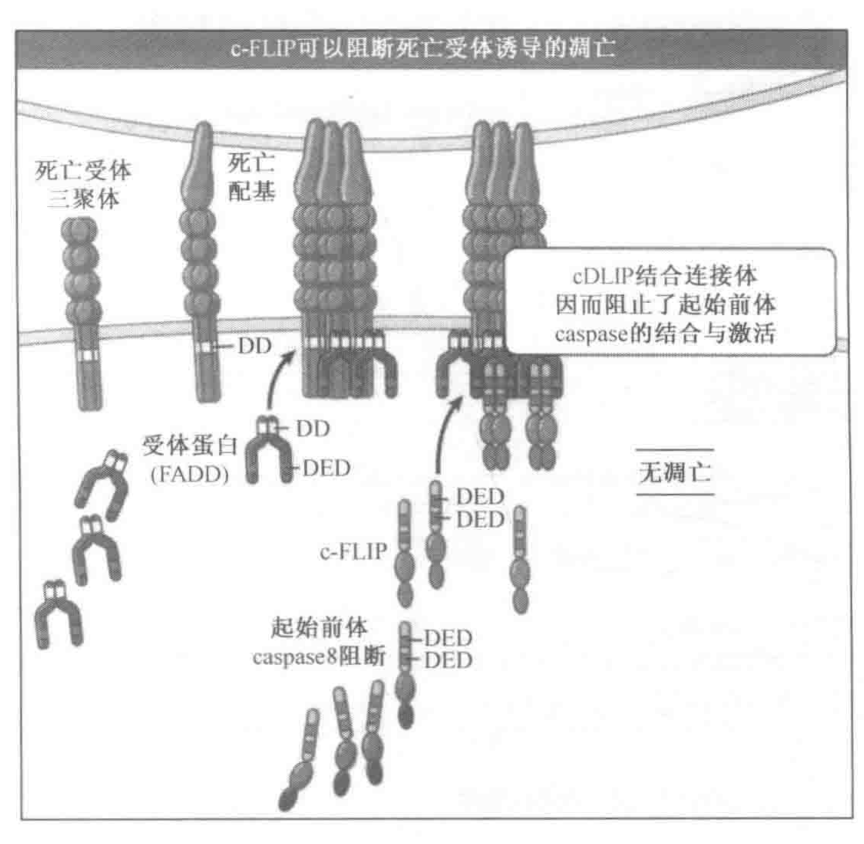


图 12.15 c-FLIP 与 caspases-8 类似，但却缺乏催化位点。c-FLIP 可以通过 DED-DED 相互作用结合到 FADD 上，从而限制 caspases-8 接近 DISC。由 NF-κB 的活化所引起的 c-FLIP 的表达是 NF-κB 抑制死亡受体介导的凋亡的一条途径。

像这样由 c-FLIP 介导的对凋亡的抑制作用可见于活化的淋巴细胞中。这些 T 淋巴细胞会表达 Fas，但在活化后的最初几天里，这些 T 淋巴细胞可以抵抗 Fas 介导的细胞凋亡。此后，这些 T 淋巴细胞又会变得对凋亡敏感。T 淋巴细胞从抗性向易感性的转变与 c-FLIP 的表达成反比，更重要的是，对 c-FLIP 的抑制可以使活化的 T 淋巴细胞对 Fas 介导的细胞凋亡更加敏感。

尽管我们已经很了解死亡受体通路（或许正因为如此），但令人奇怪的是，敲除

FADD 、c-FLIP 或 caspases-8 的动物的表型（phenotype）都与死亡受体缺陷的动物的表型有着显著的不同。这些突变小鼠都会在胚胎早期阶段死亡，很明显这不是由凋亡缺陷引起的。在胚胎发育的关键时期，这些分子似乎是参与细胞存活的信号通路所必需的。这些信号究竟是什么似乎还很不清楚。

12.8 细胞凋亡的线粒体通路

关键概念

- 哺乳动物细胞中的很多凋亡过程是通过以下通路进行的，即线粒体外膜遭到破坏，膜间隙中的物质被释放到细胞质中。
- 线粒体外膜的通透化（mitochondrial outer membrane permeabilization，MOMP）是这条通路的重要特征。

在脊椎动物中，多数细胞凋亡并不是由死亡受体引发的，而是由线粒体通路介导的。这一通路被激活时，线粒体的外膜被破坏，膜间隙中的可溶性蛋白扩散到细胞质中。线粒体外膜的通透化（MOMP）是受到严格调控的，并且是这条通路中的特征性事件。图 12.16 显示线粒体凋亡通路，在以下的四节中我们将详细阐述这一通路。

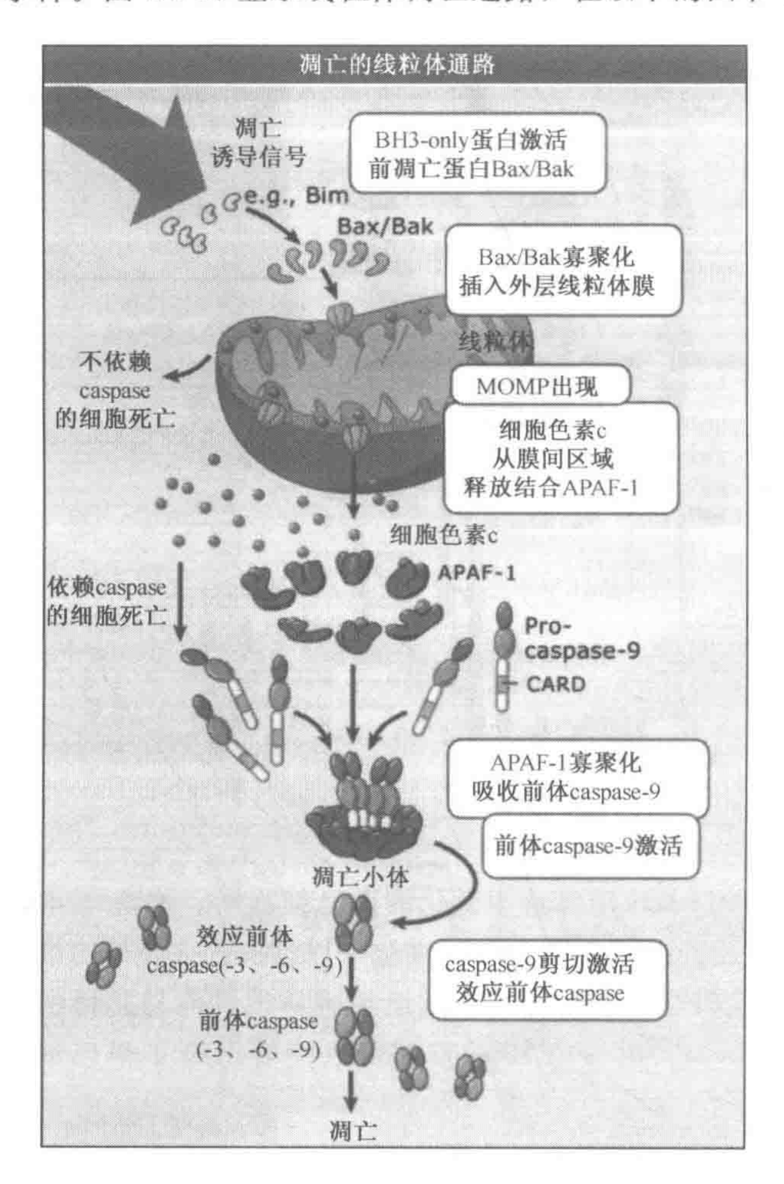


图 12.16 诱导细胞凋亡的信号可以引发 Bcl-2 家族蛋白的改变，这一家族蛋白可以抑制凋亡（抗凋亡蛋白）也可以促进凋亡（促凋亡蛋白）。其结果可能是促凋亡的、多结构域的 Bcl-2 蛋白被活化，从而导致细胞中所有的线粒体发生外膜通透化。线粒体外膜通透化（MOMP）使得膜间隙中的蛋白质可以扩散到细胞质中，这其中就包括了细胞色素 c，它可以活化 APAF-1。活化的 APAF-1 可以募集并活化起始 caspases-9，而 caspases-9 又可以裂解并活化效应 caspases，从而引起细胞凋亡。

通过 MOMP 释放的蛋白质包括细胞色素 c (holocytochrome c)，其与胞质蛋白相互作用，在 caspases 的活化中发挥重要作用。细胞色素 c 的这一功能与其在线粒体电子传递链中的作用完全不同，在线粒体中细胞色素 c 将电子从复合体Ⅲ (complexⅢ) 传递到复合体Ⅳ (complexⅣ)。经过 MOMP 释放的其他蛋白质也参与了这一凋亡形式中 caspases 的活化。

在凋亡过程中，MOMP 的出现是一个突发事件，瞬间内，细胞中所有的线粒体都释放蛋白质。在一个被诱导产生凋亡的细胞群里，某一特定细胞发生 MOMP 的时间是无法预测的，但是这个过程一旦开始，就会在几分钟内完成。因此，使用大量的细胞群来研究 MOMP 是很困难的，目前我们对 MOMP 的了解大多是来自于对分离的线粒体或单个细胞所进行的观察。图 12.17（见图版）显示细胞色素 c（绿色）从线粒体（红色）中释放。

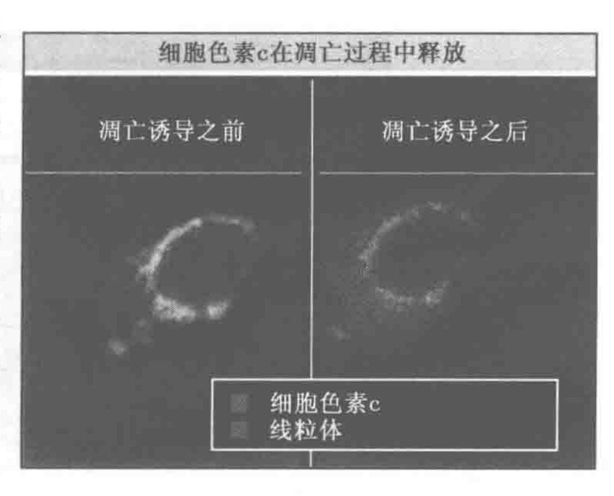


图 12.17　细胞表达连接有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein) 的细胞色素 c (cytochrome c-GFP)，同时用四甲基罗丹明乙酰酯 (tetramethylrhodamine ethyl ester) 染色以鉴别线粒体（红色）（左图）。细胞凋亡被诱导后，细胞色素 c-GFP 突然从线粒体扩散至细胞质中（右图，诱导后几小时）。而在这之后的几分钟内 caspases 即被活化。照片由 St. Jude 儿童医院的 Joshua C. Goldstein 和 Douglas R. Green 惠赠。

12.9　Bcl-2 家族蛋白可介导并调控 MOMP 以及细胞凋亡

关键概念

- Bcl-2 家族的蛋白在线粒体凋亡通路中居核心地位。
- 有三类 Bcl-2 蛋白，它们可以诱导、直接引发或抑制 MOMP。

在细胞凋亡过程中 MOMP 受到严格调控，是否发生 MOMP 是决定细胞“生”与“死”的核心所在。Bcl-2 家族蛋白的功能就是决定这一事件是否发生。

尽管人们早就认识到 Bcl-2 家族的蛋白在凋亡调控中发挥重要作用（正调控或负调控），但直至线粒体通路被阐明，它们的功能才被逐步揭示。现已知，Bcl-2 家族蛋白调控凋亡的主要途径就是调节线粒体外膜通透化。

如图 12.18 所示，Bcl-2 家族的蛋白具有多至四个的 Bcl-2 同源区 (BH)。图 12.19 显示，到目前为止已知的 Bcl-2 家族蛋白在结构上非常相似。并且它们与一些细菌的细胞膜孔形成蛋白 (pore-forming protein)，如白喉毒素的 B 链 (diphtheria toxin B chain) 在结构上也很相似，因而推测，Bcl-2 家族蛋白可能与膜孔的形成有关。

现已鉴别出三个 Bcl-2 蛋白亚家族。它们分别是：抗凋亡蛋白、促凋亡的多结构域蛋白（也被称为 BH-1，-2，和-3 蛋白，因为它们都带有 BH-1，-2，和-3）以及促凋亡的只含 BH-3 的蛋白。抗凋亡的 Bcl-2 蛋白拥有 BH-4 结构域并能够阻止 MOMP，而促凋亡的 Bcl-2 蛋白缺少 BH-4 结构域并且能够促进线粒体外膜 MOMP。然而，并不仅仅

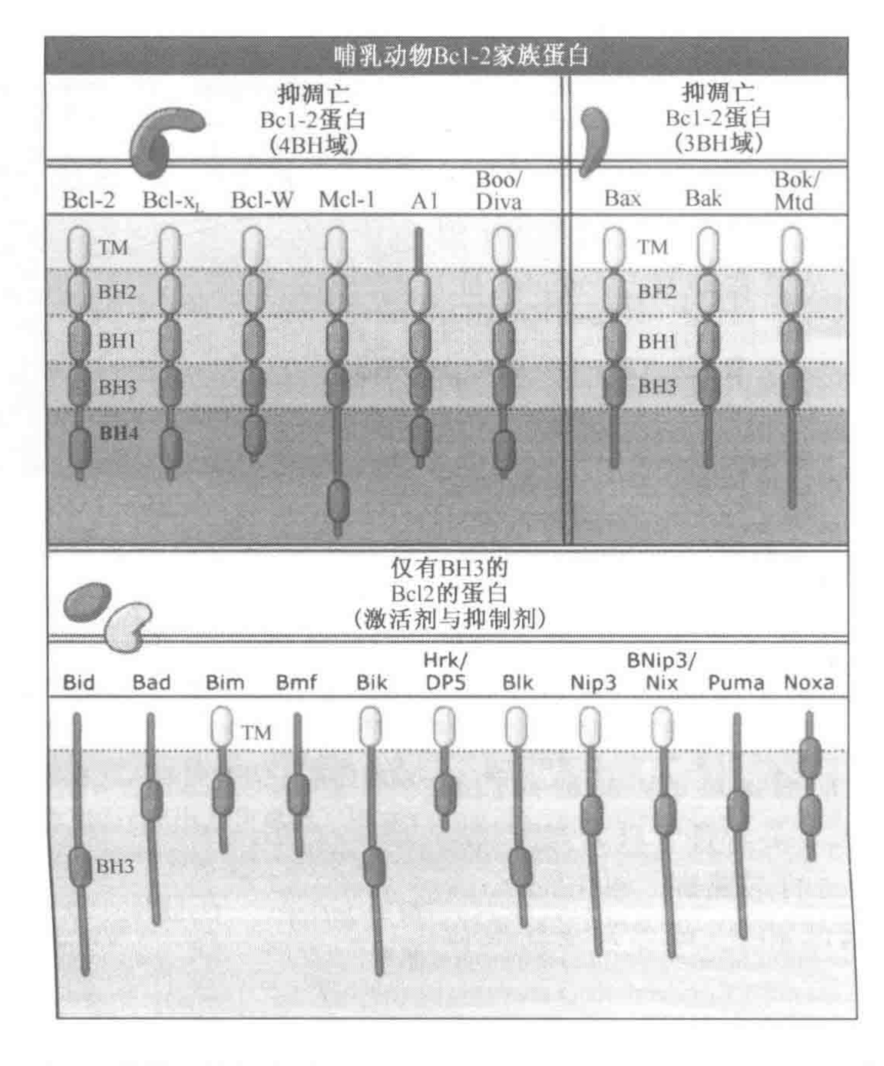


图 12.18　Bcl-2 家族蛋白最多拥有四个 Bcl-2 同源区（BH），这些蛋白可以是抗凋亡的也可以是促凋亡的。促凋亡蛋白包括多结构域蛋白和只含 BH-3 的蛋白。

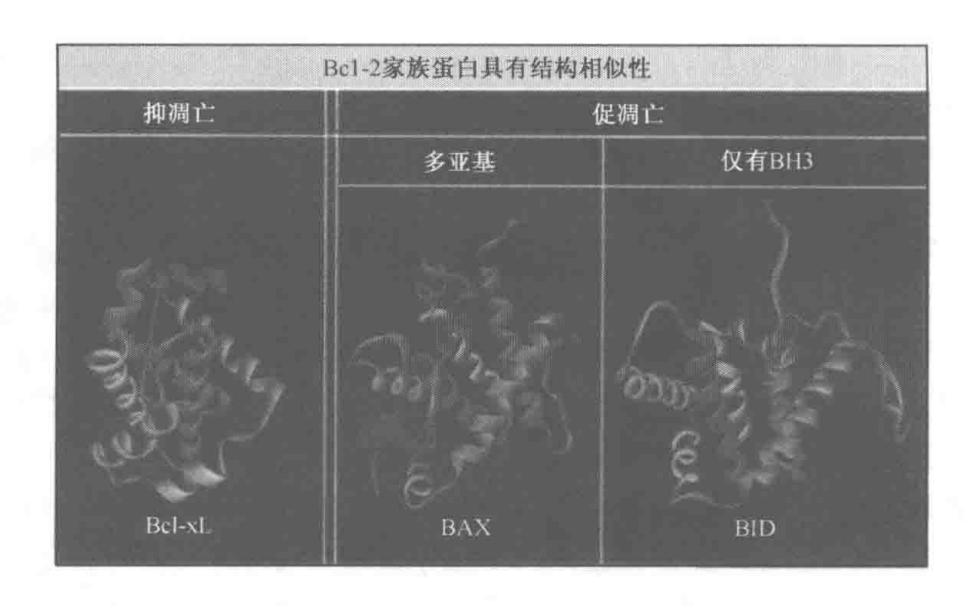


图 12.19　抗凋亡 Bcl-2 蛋白（如 Bcl-xL）与促凋亡 Bcl-2 蛋白（Bax、Bid）的结构非常相似。结构来自 Protein Data Bank files 1PQ0、1F16 和 1DDB。

只有 BH-4 结构域在抑制 MOMP 中发挥作用。

12.10 多结构域的 Bcl-2 家族蛋白 Bax 和 Bak 是 MOMP 所必需的

关键概念

- Bax 和 Bak 是线粒体外膜通透化所必不可少的，也是线粒体凋亡通路所必需的。
- Bax 和 Bak 可能会直接导致与线粒体外膜通透化相关的膜损伤。

Bax 和 Bak 是 Bcl-2 家族中的两个多结构域蛋白。这两种蛋白能导致线粒体外膜通透化，并在膜上形成孔道，线粒体膜间隙中的蛋白借此可以扩散出来。图 12.20 显示，在只含 BH-3 结构域的蛋白（如 Bid 蛋白）存在的情况下，Bax 和 Bak 会被诱导在线粒体膜处发生寡聚化。

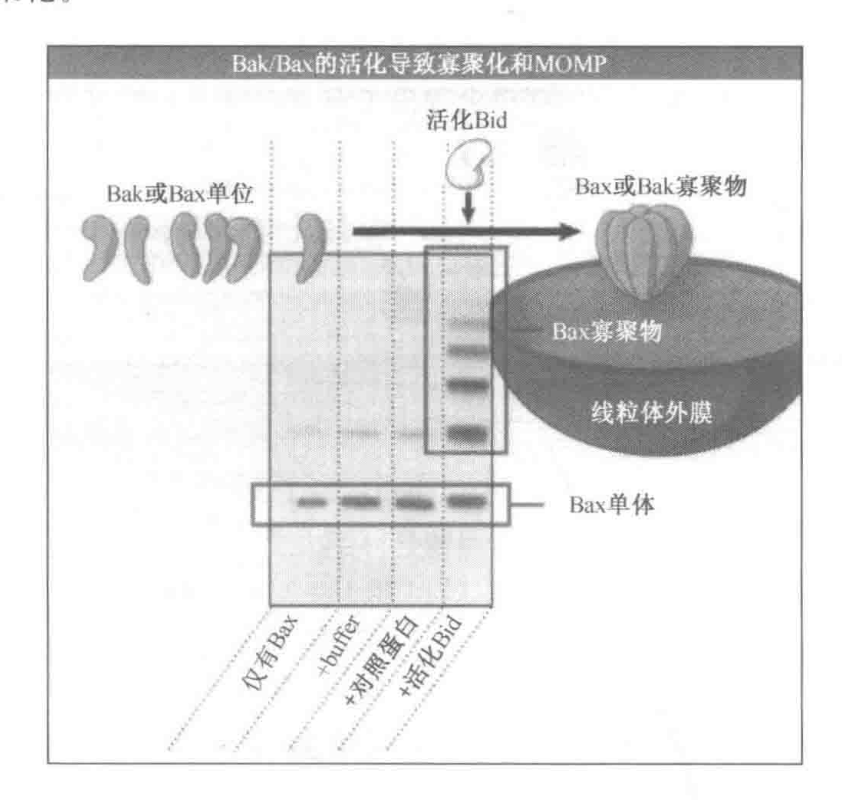


图 12.20 当 Bax 或 Bak 被只含 BH-3 结构域的蛋白（甚至是类似于 BH-3 结构域的肽段）活化后，就会插入线粒体的外膜并发生寡聚化。这会导致线粒体外膜通透化，但机制现在还不清楚。左侧的实验显示寡聚化的存在；Bax 和线粒体脂类膜泡（lipid vesicle）在一起孵育并与活化的只含 BH-3 结构域的蛋白——Bid 相混合。交联的蛋白通过电泳（electrophoresis）被分解，并对 Bax 进行免疫印迹显色。活化的 Bid 可以引起 Bax 的寡聚化。照片由 St. Jude 儿童医院的 Jerry Chipuk 和 Douglas R. Green 惠赠。

在小鼠中，利用基因敲除技术消除多结构域蛋白的研究，帮助我们确定了这些多结构域蛋白在 MOMP 中的作用。缺乏 Bak 的小鼠表型极其正常，缺乏 Bax 的小鼠尽管呈现一些发育上的缺陷，但发育基本正常，这一结果有些令人失望。直到人们培育出同时缺乏这两种蛋白的双基因敲除（double knockout，DKO）小鼠时，研究才取得了重大进展。结果显示，DKO 小鼠存在多种凋亡缺陷，在胚胎期和围产期（perinata）致死。更为重要的是，这些双基因敲除小鼠的细胞在应答多种凋亡刺激时，不能引起 MOMP

或细胞凋亡。

不仅是Bax-Bak DKO小鼠细胞能完全抵制多种细胞凋亡，而且进一步的分析还揭示了一个重要的规则。如果培养中的野生型细胞不是取自肿瘤，则这些细胞的生存要依赖于生长因子，这些生长因子不仅可以阻止细胞凋亡，还能参与营养吸收和新陈代谢，即使这些细胞是取自肿瘤，也经常会出现上述情况（见13.2癌细胞拥有许多表型特征）。但如果不为Bax-Bak DKO细胞提供生长因子，它们并不会死亡，却会发生自噬作用（autophagy，self-eating），它们会通过代谢细胞内组分而自我维持几周。因为缺乏Bax和Bak，所以这些细胞走向线粒体凋亡通路，因而能持续存活较长的时间。

以上揭示出的规则是，当缺少细胞凋亡时，细胞在不良生长条件下也可以存活（尽管需要自吞噬作用），如果线粒体凋亡通路完好无损，则失去生存因子的细胞就会死亡。由于在多细胞有机体中，一种细胞需要的生长因子和存活因子通常是由另一种细胞产生的，所以动物体这个“细胞社会”在很大程度上是通过凋亡来维持的（在脊椎动物中，至少是通过线粒体凋亡通路来维持的）。

12.11 Bax和Bak的活化受到其他Bcl-2家族蛋白的调控

关键概念

- Bcl-2家族的抗凋亡成员可以阻止由Bax和Bak引起的线粒体外膜通透化。
- Bcl-2家族中只含BH-3结构域的蛋白不仅可以直接活化Bax和Bak，而且可以干扰抗凋亡Bcl-2蛋白的功能。

通常，Bax和Bak只有在被其他蛋白活化（或是通过其他机制被活化）后才会导致MOMP。虽然只含BH-3结构域的蛋白（Bid和Bim）特别擅于通过诱导寡聚化来活化Bax和Bak，但几乎可以肯定还存在其他的活化因子（可能还包括非Bcl-2家族的蛋白）。

Bax和Bak的活化及其功能会被Bcl-2家族的抗凋亡成员所抑制，这些抗凋亡蛋白包括Bcl-2、Bcl-xL和Mcl-1等。这些抗凋亡蛋白可以结合到活化因子上并抑制它们的功能，也可以结合到活化的Bax和Bak上，如图12.21的上半部分所示。通过这种途径，抗凋亡的Bcl-2蛋白可以抑制MOMP以及细胞凋亡。

只含BH-3结构域的蛋白亚家族中的其他成员并不是通过直接活化Bax和Bak来促进凋亡的，而是通过抑制抗凋亡的Bcl-2家族蛋白的功能来促进凋亡的。这些蛋白是去阻遏物（derepressor）或称为增感剂（sensitizer），因为它们能使细胞对凋亡的诱导更敏感。

只含BH-3结构域的蛋白（去阻遏物）和活化因子所产生的联合效应会通过Bax和Bak起作用，从而导致MOMP及细胞凋亡，这种联合效应还会受到抗凋亡Bcl-2蛋白的抑制。只含BH-3结构域的蛋白在转录水平、蛋白质稳定性、与其他蛋白的相互作用以及影响其功能的修饰上都受到了调控。由于只含BH-3结构域的蛋白的调控途径是多样化的，所以这些蛋白被视为“胁迫感受器”（stress sensor），它们将特异刺激和MOMP与凋亡联系起来。

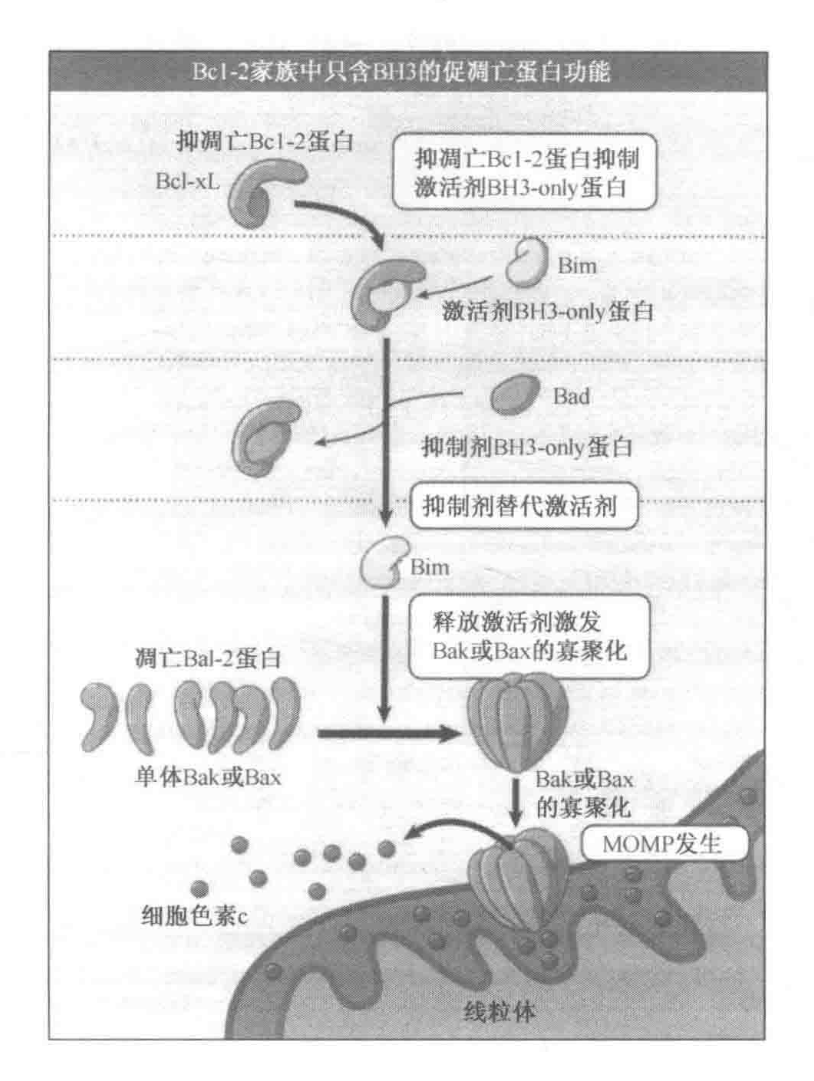


图 12.21 只含 BH-3 结构域的蛋白既可以直接活化 Bax 或 Bak（作为活化因子），也可以干扰抗凋亡的 Bcl-2 蛋白的功能。

12.12 通过 MOMP 释放的细胞色素 c 诱导 caspase 的活化

关键概念

- 成熟的细胞色素 c 会引起胞质中 APAF-1 的活化，而活化的 APAF-1 可以结合并激活 caspases-9。

由于 MOMP，线粒体膜间隙中的可溶性蛋白扩散到了细胞质中，并在此处与胞质蛋白相互作用。那么，这种蛋白从线粒体中的释放如何导致 caspases 的活化呢？在细胞质中，成熟的细胞色素 c（结合有血红素基团的细胞色素 c）会与凋亡蛋白酶活化因子-1（apoptotic protease activating factor-1，APAF-1）结合，从而使 APAF-1 发生构象改变，这种构象的变化使得 dATP 结合到 APAF-1 上。而这又使得 APAF-1 的结构进一步发生变化，并暴露出寡聚化结构域，从而形成了由七个 APAF-1 分子组成的复合体，该复合体被称为凋亡体（apoptosome），在凋亡体的中心具有暴露的 CARD 结构域。它们可以与起始 caspases—— caspases-9 的 CARD 相结合，这种结合迫使 caspases-9 发生二聚化，从而通过诱导临近效应最终导致 caspases-9 的活化。图 12.22 显示凋亡体的形成过程以及它与 caspases-9 的结合过程。caspases-9 一旦被活化，就会裂解并

激活效应 caspases、caspases-3 和 caspases-7，进而引起细胞凋亡。

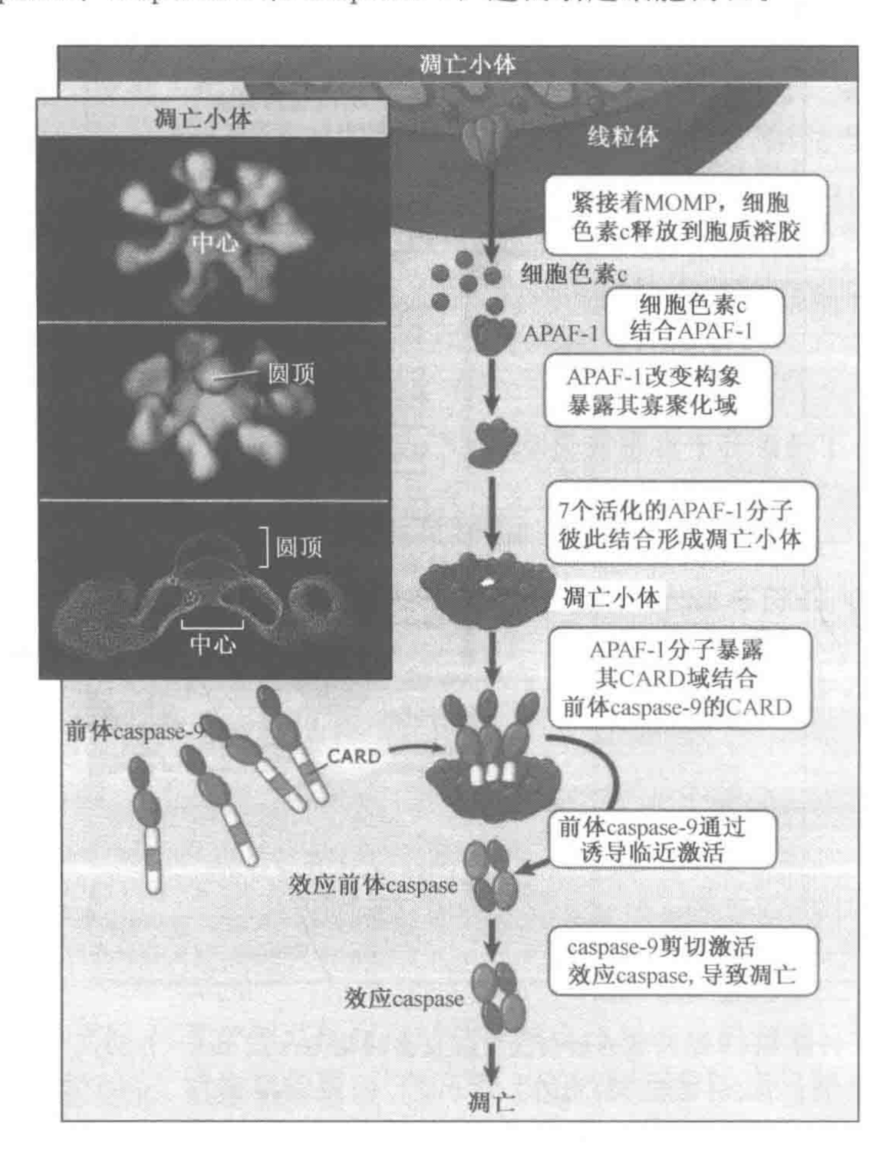


图 12.22　细胞色素 c 激活 APAF-1，促进凋亡体的形成。一旦细胞色素 c 从线粒体膜间隙释放到细胞质中，即可与 APAF-1 相结合，导致 APAF-1 的构象发生改变，暴露出寡聚化结构域。活化的 APAF-1 之间相互结合，形成复合体，即凋亡体。凋亡体中的每一个 APAF-1 分子都会暴露出它的 CARD，这些 CARD 可与 caspases-9 中的 CARD 结合，从而活化 caspases-9。而活化的 caspases-9 就能够去裂解并激活效应 caspases。在插图中，显示了由电子显微镜技术确定的凋亡体的结构。复制自 Mol. Cell，vol. 9，Acehan，D.，et al.，*Three-Dimensional Structure of the Apoptosome*…，pp. 423-432. Copyrighted 2002，获得 Elsevier 许可。照片由 Boston 大学医学院的 Christopher W. Akey 惠赠。

细胞色素 c 是在细胞核中编码的，脱血红素细胞色素 c（apocytochrome c）分子被转运到线粒体的膜间隙中，在那里，通过酶促作用，连接上血红素基团。只有成熟的细胞色素 c 才能够活化 APAF-1，从而使之结合 dATP 并形成凋亡体，这样就保证了由线粒体通路激活的凋亡只有在出现 MOMP 的前提下才能发生。

缺乏 APAF-1、caspases-9 或 caspases-3 的小鼠都会出现发育上的缺陷，这些发育缺陷与线粒体通路没有适时活化密切相关。这种表型在另外一种突变小鼠身上也会出现，这种突变小鼠细胞内的细胞色素 c 发生了变化，突变的细胞色素 c 虽然还保持其在

线粒体呼吸上的功能，但其促进凋亡体形成的活力却大大降低。这些小鼠存在颅面发育上的缺陷，前脑体积显著增大。有趣的是，程序性细胞死亡在这些动物体内依然可以进行，尽管发生的速度更慢并且没有出现凋亡的典型特征。这种不依赖于 caspases 的细胞死亡将在 12.15 MOMP 可引起 caspase-非依赖的细胞死亡中详细讨论。

12.13 一些经 MOMP 而释放的蛋白质阻抑 IAP 的作用

关键概念

- 线粒体膜间隙蛋白 Smac 和 Omi 可以拮抗 IAP 对 caspases 活性的抑制作用。

如 12.4 一些凋亡蛋白抑制因子（IAP）对 caspases 的阻抑作用所述，一些 IAP 能抑制 caspases 的活性，尤其是 XIAP，它能结合并抑制凋亡体中 caspases-9 的活性，也可以结合并抑制 caspases-3 和 caspases-7，从而抑制细胞凋亡。至少有两种由于 MOMP 而释放的蛋白质能够拮抗 XIAP 的活性，从而，caspases 的活化可以继续进行，如图 12.23 所示。这两种蛋白分别是 Smac（也称为 DIABLO）和 Omi（也称为 HtrA2）。人们只在脊椎动物中发现了 Smac，但在从酵母到脊椎动物体中，Omi/HtrA2 都是高度保守的。

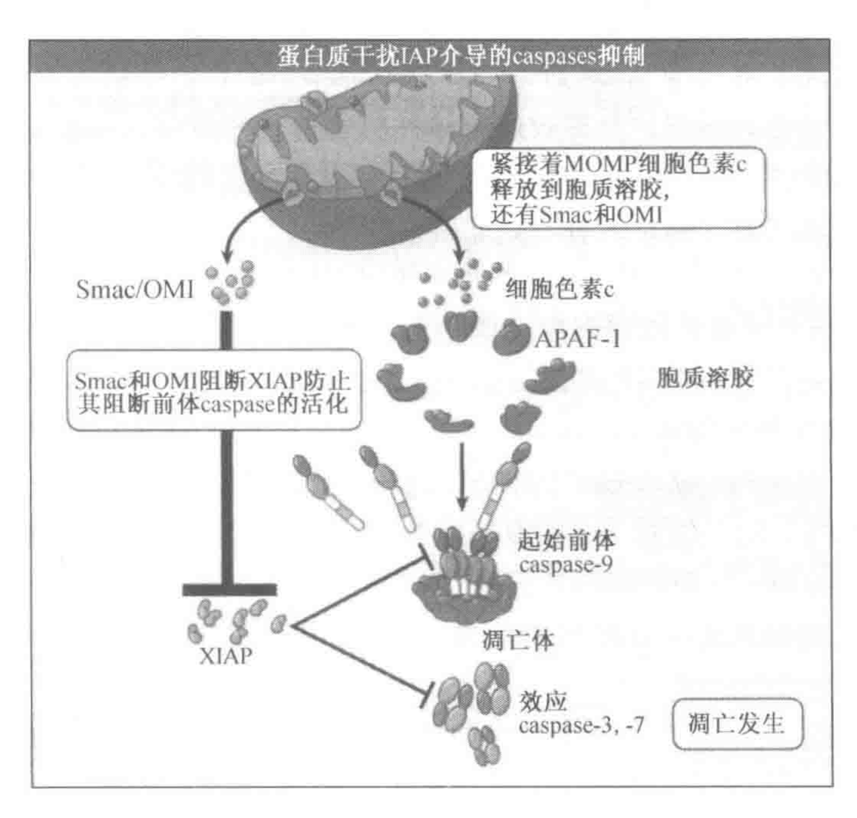


图 12.23 经 MOMP 而释放的蛋白能够干扰 IAP 介导的对 caspases 的抑制作用。

在 Smac 和 Omi 分子中，N 端序列负责抑制 XIAP。这个 N 端序列被称为 AVPI 基序，是在成熟的 Smac 分子中经测序发现的。Smac 和 Omi 是核编码蛋白，只有当它们移位到线粒体膜间隙中并通过蛋白水解作用去除线粒体定位序列后，才能够产生 AVPI 基序。因此，只有当 Smac 和 Omi 通过线粒体外膜通透化从线粒体膜间隙释放出来后，它们才能够干扰 XIAP 的功能。

敲除 XIAP 和 Smac 只有很少的或甚至没有明显的表型出现，而敲除 Omi 则会显示出神经系统的缺陷，这种缺陷可能是由于某个与线粒体相关的活性丧失引起的，而与其所具有的抑制 IAP 的功能无关。支持这种解释的依据包括：Omi 分子的 IAP 抑制基序在一些脊椎动物如牛中都丢失了。与之相似，同时缺乏 Smac 和 Omi 的细胞似乎没有出现凋亡方面的缺陷。IAP 抑制 caspases 的生物学重要性以及诸如像 Smac 和 Omi 此类的 IAP 拮抗物抑制 IAP 的生物学重要性还是悬而未决的问题。

12.14 细胞凋亡的死亡受体通路通过裂解只含有 BH3 结构域的 Bid 蛋白引起 MOMP

关键概念

- 由于死亡受体交联而活化的 caspases-8 能够裂解只含有 BH3 结构域的 Bid 蛋白，从而导致 Bid 蛋白的活化。
- 随后，Bid 可以促使 Bax 和 Bak 发挥作用，引起 MOMP，从而启动了线粒体凋亡通路。
- Bid 可以作为两条凋亡通路的连接者。

由于 XIAP 能够抑制效应 caspases——caspases-3 和 caspases-7 的活性，所以它能够抑制由死亡受体和起始 caspases——caspases-8 引起的细胞凋亡（见 12.6 细胞凋亡的死亡受体通路呈递外部信号）。然而，一旦 caspases-8 被死亡受体通路活化，就可以参与凋亡的线粒体通路，这样就会导致线粒体外膜通透化的发生。caspases-8 是通过裂解并激活只含有 BH3 结构域的 Bid 蛋白来实现这一过程的。随后，由于 MOMP 而引起的 IAP 拮抗因子的释放对于凋亡的进行是非常重要的。

就像先前讨论的 Bim 一样，Bid 能够活化 Bax 和 Bak，从而引起 MOMP。然而，Bid 蛋白只有被蛋白水解作用裂解后才能活化。有一些蛋白酶可以裂解并激活 Bid，从而通过线粒体通路引起 MOMP 以及细胞凋亡，这些蛋白酶包括：组织蛋白酶（cathepsins）、钙蛋白酶（calpains）和 caspases。caspase-8 能极其有效地裂解及激活 Bid。事实上，相对于效应 caspases 来说，Bid 是 caspases-8 的最适底物。

因此，当 caspases-8 裂解 Bid 而引起 MOMP 时，产生的效应之一就是释放 IAP 拮抗物，即 Smac 和 Omi，而这两种拮抗物可以抑制 XIAP 并促进效应 caspases 的活化。与此同时，由于细胞色素 c 介导的凋亡体和 caspases-9 的活化，凋亡信号被进一步放大。图 12.24 显示上述过程。

MOMP 在促进死亡受体通路上的重要性因细胞种类不同而有所不同。在 TypeⅡ细胞中，抗凋亡的 Bcl-2 蛋白，如 Bcl-2 和 Bcl-xL，对 MOMP 的抑制作用可以阻止死亡受体引起的细胞凋亡。而在 TypeⅠ细胞中，抗凋亡的 Bcl-2 蛋白却对死亡受体通路没有影响。基于上述考虑，目前研究人员正在对可以模拟 IAP 拮抗因子的药物进行研究，检测它们通过死亡配体，如 TRAIL 来增强癌症治疗效果的能力。

这种影响在细胞毒淋巴细胞诱导的细胞凋亡过程中也很重要。尽管粒酶 B 能有效地活化效应 caspasess，但这种活性可以被 XIAP 所抑制。然而，粒酶 B 就像 caspases-8 一样，能有效地裂解并激活 Bid（虽然裂解位点不同），从而引起 MOMP。有证据表明，在至少一些类型的靶细胞中，由粒酶 B 和细胞毒淋巴细胞引起的凋亡更倾向于采用 Bid

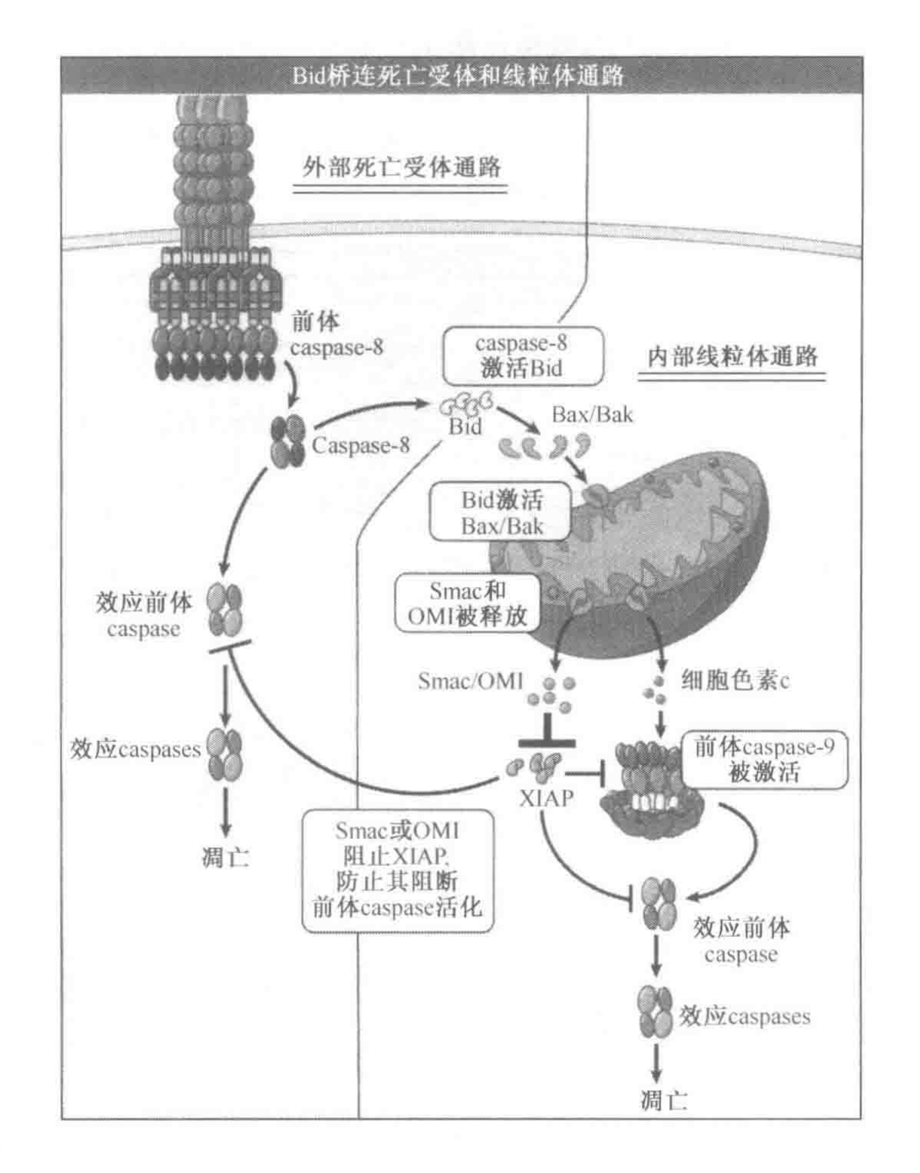


图 12.24 死亡受体通路会诱导 caspases-8 的活化，而活化的 caspases-8 可以裂解并激活只含有 BH3 结构域的 Bid 蛋白。活化的 Bid 蛋白可以激活 Bax 和 Bak，从而促进线粒体外膜通透化和细胞色素 c 的释放。结果，caspases-9 被活化。而且，由于线粒体外膜通透化而释放的 Smac 和 Omi 可以有效拮抗任何由 IAP 介导的对效应 caspases 活化的抑制作用。

介导的 MOMP 机制。然而，细胞毒淋巴细胞的功能不仅涉及粒酶 B 的释放，因为这些细胞也会利用其他的机制来诱导细胞死亡。

12.15 MOMP 可引起 caspase 非依赖的细胞死亡

关键概念

- **一般情况下，一旦发生线粒体外膜通透化，即使 caspases 的活化被抑制或被破坏，细胞也会死亡。这种细胞死亡的精确机制还很不清楚。**

一旦凋亡的线粒体通路被活化并发生了线粒体外膜通透化，即使 caspases 的活性被抑制或被破坏，细胞依然会死亡。如前所述，发育中的小鼠，即使缺乏 APAF-1 和

caspases-9，体内依然会有程序性细胞死亡发生，只不过以一种表型不同的方式替代了本该通过凋亡来执行的过程。例如，缺陷小鼠指（趾）间蹼状结构中的细胞也会发生死亡（从而使手指和脚趾得以形成，见图 12.1）但却不会出现野生型小鼠细胞中可见到的染色质凝集。图 12.25 显示了这些细胞的外观。

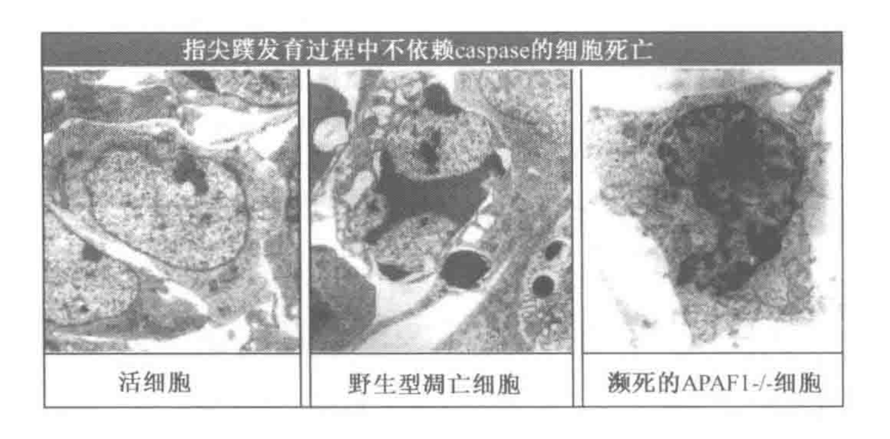


图 12.25　左图显示的是活细胞。中间图显示的是野生型小鼠蹼状结构中正在凋亡的细胞。右图显示的是 APAF-1 缺陷型小鼠的蹼状结构中正在死亡的细胞。照片由 Centre Immunologies 的 Pierre Golstein 惠赠。复制自 *Current Biology*，vol. 9，Chautan，M.，et al.，Interdigital cell death…，pp. 967-970. Copyright 1999，获得 Elsevier 许可。

相似的，能够抑制细胞凋亡的 caspases 抑制剂并不能使已经发生 MOMP 的细胞脱离这种“不依赖于 caspases”的细胞死亡。相反，能够阻抑 MOMP 的 Bcl-2 蛋白，在相同情况下却能够维持细胞存活。

研究人员提出了两种不依赖于 caspases 的细胞死亡机制。一种机制是：在发生线粒体外膜通透化之后，线粒体会慢慢地丧失其功能（在发生线粒体外膜通透化之后，线粒体功能的迅速丧失已经被证明是由活化的 caspases 引起的）。这种线粒体功能的缓慢丧失可能会使细胞死亡，尽管 caspases 并没有被活化。

另一种机制是（也有可能两种机制同时发生）：从线粒体膜间隙中释放的蛋白可能会以一种不涉及 caspases 的方式来使细胞死亡。这些蛋白包括一种 DNase、核酸内切酶 G（endonuclease G）、Omi 以及凋亡诱导因子（apoptosis inducing factor，AIF），已有研究显示，如果这些蛋白在细胞中过量表达就会诱导细胞死亡（Omi 的死亡诱导活性与其 IAP 抑制活性无关）。然而，由于这些蛋白在线粒体中还行使其他关键的功能，而这些功能又是正常细胞生理活动所必需的，所以就很难确定哪些蛋白真正参与了线粒体外膜通透化后发生的细胞死亡。这些蛋白都无法明确显示出在任何生理条件下可以在发生线粒体外膜通透化后导致细胞死亡。

一些细胞经历了线粒体外膜通透化，却没有发生不依赖于 caspases 的细胞死亡。例如，对于不在进行有丝分裂的神经元而言，去除生长因子会导致线粒体外膜通透化，但如果 caspases 的活性受到抑制，则随后通过再加入生长因子还可以使细胞继续存活。目前，我们还不清楚能够增殖的细胞能否在发生线粒体外膜通透化后存活。

12.16 线粒体通透性的转变可以导致MOMP

关键概念

- 在一些形式的细胞死亡中，线粒体内膜的改变造成线粒体损伤，最终该细胞器发生膨胀并破裂。

分离的线粒体经过在不同试剂的作用下，如高浓度的钙、活性氧基团（rezctive oxygen species，ROS）或是某些药物，线粒体的内膜会发生改变，这种变化使得小分子溶质可通过膜上的通道进出，从而导致跨膜电化学势梯度消失，线粒体的基质发生膨胀。这种基质的膨胀足以使线粒体外膜发生破裂，从而释放出膜间隙中的蛋白。这种线粒体通透性转变（mitochondrial permeability transition，mPT）在极端环境导致的细胞死亡中发挥作用，比如，可导致细胞坏死的局部贫血损伤（例如中风和心脏病）。至今还不清楚，mPT 是否在细胞凋亡中发挥作用以及在何种条件下发挥作用。

尽管关于参与 mPT 的分子还存在争议，但可以确定的是，一种称为 cyclophilin D 的基质酶促进了这个过程（虽然它并不是绝对必要的）。缺乏 cyclophilin D 的小鼠在线粒体通透性转变上存在缺陷，并且可以抵抗局部贫血损伤，但是这种缺陷小鼠在发育和凋亡过程中未见异常。能够抑制 cyclophilin D 的药物，如环孢霉素（cyclosporine）能够阻止或延迟线粒体通透性转变的发生，研究人员正在一些类型的细胞损伤中检测这种药物的有效性。

12.17 很多关于细胞凋亡的发现都是在线虫中取得的

关键概念

- 线虫体内的细胞凋亡通路比较简单，而且与脊椎动物体内细胞凋亡的线粒体通路有相似性。

在秀丽新小杆线虫（*C. elegans*）的发育过程中，成体的 1090 个体细胞（somatic cell）中有 131 个要发生程序性细胞死亡：即在每一个动物体内，细胞是在预先确定的时间和地点发生死亡。这种发育过程中的细胞死亡是通过细胞凋亡的方式来进行的。秀丽新小杆线虫凋亡通路上的分子成分绝对是这一程序性细胞死亡所必需的。对秀丽新小杆线虫中细胞凋亡的遗传学研究为理解脊椎动物的细胞凋亡通路，尤其是细胞凋亡的线粒体通路，奠定了基础，尽管它们之间还存在显著的差异。

图 12.26 显示了秀丽新小杆线虫的凋亡通路。在线虫发育过程中，负责细胞死亡的单一 caspase 就是秀丽新小杆线虫死亡基因 *ced-3* 的产物（CED-3）。与脊椎动物细胞中的 caspases-9 一样，CED-3 也包含一个 CARD 结构域，并且通过二聚化被活化。负责活化 CED-3 的接头分子与 APAF-1 具有同源性并且通过其自身的 CARD 结构域与 caspase 结合。这一接头分子被称为 CED-4，它与 APAF-1 的不同之处在于，它不能被细胞色素 c 活化（事实上，CED-4 缺乏与细胞色素 c 相互作用的区域）。CED-4 可能需要 dATP 的参与来实现其寡聚化，而 CED-4 的寡聚化又是 CED-3 活化所需要的。

在活细胞中，CED-4 被另一种蛋白，即 CED-9 所结合。显然，CED-9 是 Bcl-2 的同源物，但与脊椎动物的抗凋亡 Bcl-2 蛋白不同的是，CED-9 不能调控线粒体外膜通透

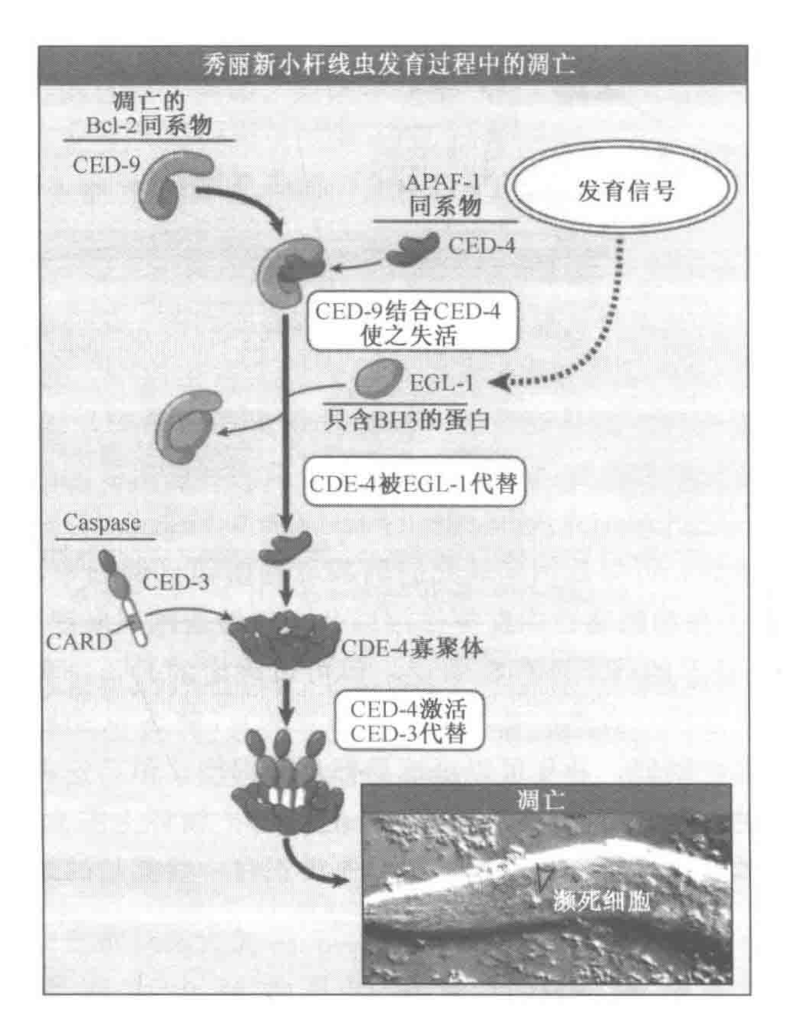


图 12.26 照片显示线虫胚胎中一个正在死亡的细胞。图表显示的是调控线虫程序性细胞死亡的蛋白之间的关系。照片复制自 Cell，vol. 44，Ellis，H. M.，and Horvitz，H. R. *Genetic control of programmed*…，pp. 817-827. Copyright 1986，获得 Elsevier 许可。照片由麻省理工学院的 H. Robert Horvitz 惠赠。

化。CED-9 通过直接与 CED-4 结合来调控凋亡。相反，在脊椎动物的抗凋亡 Bcl-2 家族成员中，没有任何一种蛋白是可以结合或直接抑制 APAF-1 的（并且如果 CED-9 在脊椎动物细胞中表达，则不能抑制细胞凋亡）。

CED-9 与 CED-4 的结合会被另一种蛋白所破坏，这种蛋白是 *egl-1* 基因的产物（*egl* 代表“产卵缺陷”）。EGL-1 是一种只含 BH-3 结构域的蛋白。当细胞表达 EGL-1 蛋白时，EGL-1 就可以将 CED-4 从 CED-9 那里置换出来，这样 CED-4 就可以活化 CED-3，从而使细胞死亡。

Egl-1、*ced-4* 或 *ced-3* 发生功能丧失性突变就会使细胞得以存活，这些细胞就可以分化成为功能性细胞。*Ced-9* 发生功能获得性突变会产生相同的效果。*Ced-9* 功能的丧失会导致早期胚胎致死，这一现象可被 *ced-4* 或 *ced-3*（而不包括 *egl-1*）的功能丧失性突变所抑制。

还有其他基因也参与调控正在死亡的细胞所发生的一些事件，包括吞噬作用（phagocytosis）和降解（degradation）。这些内容将在 12.19 凋亡细胞的清除需要细胞的相互作用中详细讨论。

12.18 昆虫细胞的凋亡与哺乳动物和线虫有所不同

关键概念

- **昆虫细胞的凋亡通路与脊椎动物细胞凋亡的线粒体通路有相似性。**

与线虫类似，昆虫细胞的凋亡通路与脊椎动物细胞凋亡的线粒体通路有基本的相似性，但也存在一些重要的不同之处。在黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）中，发育信号（如蜕皮激素）或细胞所受到的威胁（如 DNA 损伤）会诱导细胞发生凋亡。黑腹果蝇细胞凋亡的基本特点类似于脊椎动物和线虫。

图 12.27（见图版）显示的是果蝇的凋亡通路。在昆虫细胞中，参与执行凋亡的效应 caspases 是 DRICE 和 DCP-1。研究人员推测，裂解这些效应 caspases 可以使其活化，但是还没有得到正式的确认。负责活化这些效应 caspases 主要起始 caspases 是 DRONC，它和 caspases-9 以及 CED-3 一样，也具有一个 CARD 结构域。另一个潜在的

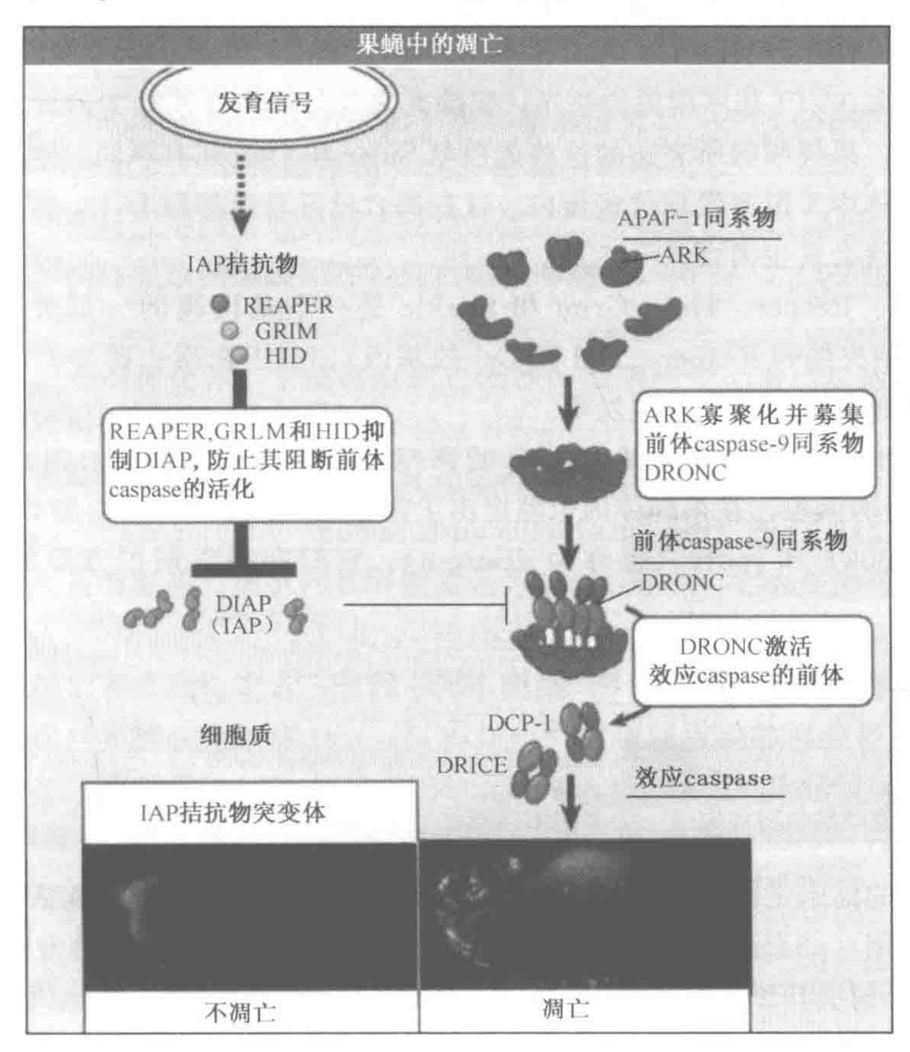


图 12.27 右边的照片显示的是在野生型果蝇中，以细胞凋亡机制进行的程序性细胞死亡。利用吖啶橙染色（acridine orange staining）来检测正在死亡的细胞（亮绿色），并用其他一系列的技术来确认细胞的死亡。左边的照片显示的是在编码 Reaper、Hid 和 Grim 的基因处发生突变的果蝇胚胎中没有发生程序性细胞死亡的细胞。图表则描绘了果蝇主要的凋亡通路。照片由 UT 西南医学中心（Dallas）的 John Abrams 惠赠。

起始 caspases 是 DREED，它与 caspases-8 一样，在其前结构域中具有 DED。然而，在果蝇的任何形式的凋亡中，DREED 的作用都不明确。

在昆虫细胞中，DRONC 是被 ARK（APAF-1-related killer）所活化的，ARK 是 APAF-1 的同系物。尽管在 APAF-1 上发现的结构域在 ARK 上都有，但目前还没有生化证据表明 ARK 是被细胞色素 c 活化的。相似的，在昆虫的凋亡细胞中还没有观察到线粒体外膜通透化以及细胞色素 c 的释放。据称，ARK 要么具有组成型活性，要么就是被某种不依赖于线粒体外膜通透化的机制所激活。与 APAF-1 和 CED-4 一样的是，ARK 可能也形成寡聚结构，然后通过 CARD-CARD 的相互作用与 DRONC 结合，从而激活起始 caspase。缺乏 ARK 或 DRONC 的果蝇不会出现细胞凋亡，而 ARK 或 DRONC 的表达被抑制的果蝇细胞也同样不会出现凋亡。

然而，DRONC 的活化并不足以引起细胞凋亡。IAP，尤其是 DIAP1 能够抑制 DRONC 和效应 caspases，从而维持细胞存活。这是果蝇凋亡通路的关键所在。

当凋亡被引发时，果蝇细胞会表达一种或多种能够抑制 IAP 功能的蛋白。这些蛋白——Reaper、Hid（Head involution defective）、Grim 和 Stickle——都带有一个与 Smac 和 Omi 的 AVPI 基序相关的基序，但除此之外与任何脊椎动物的分子就没有相似之处了。而且，果蝇细胞所表达的这些蛋白与 Smac 和 Omi 还有不同：这些蛋白是胞质蛋白，在线粒体中并没有发现这些蛋白。这些凋亡诱导者可抑制 IAP，这样 DRONC 就会活化，细胞就会发生凋亡。

有趣的是、Reaper、Hid、Grim 和 Stickle 是一个基因簇的一部分。缺失体 *DF*（*3L*）*H99*（缺失编码 Reaper、Hid 和 Gri 的基因），由于在凋亡诱导上存在缺陷而被鉴定出来，上述这些基因由此被发现。

昆虫细胞的凋亡似乎主要是受 IAP 的调控，而脊椎动物细胞的凋亡则主要是受 Bcl-2 家族蛋白的调控。在果蝇体内也鉴定出了两个 Bcl-2 蛋白，分别是 Debcl（也称为 dBorg-1d 和 dBok）和 Buffy（也称为 dBorg-2）。它们在凋亡调控方面的功能还有待研究。

12.19 凋亡细胞的清除需要细胞间的相互作用

关键概念

- 将凋亡细胞从体内清除是一个主动的过程。

清除死亡的细胞是凋亡的最终目的，这些细胞会被几乎不留痕迹地从体内清除。这是通过吞噬作用（phagocytosis）来完成的，参与吞噬作用的既可以是专门的吞噬细胞（如巨噬细胞、树突状细胞），也可以是“业余者”（如上皮细胞）。细胞凋亡的特点强调了有效清除凋亡细胞的重要性，细胞凋亡的特点可能会促进清除过程的进行，由于凋亡细胞是包裹着被清除的。DNA 会被切割成小片段以利于消化，细胞会裂解成“诱饵大小的”片段，而且细胞还会产生信号来诱导自身被吞噬。最后的这个过程可以被总结为细胞产生“发现自己”的信号和“吞噬自己”的信号以及破坏“不要吞噬自己”的信号，如图 12.28 所示。

对秀丽新小杆线虫的研究发现了在清除凋亡细胞方面具有重要作用的基因，它们分

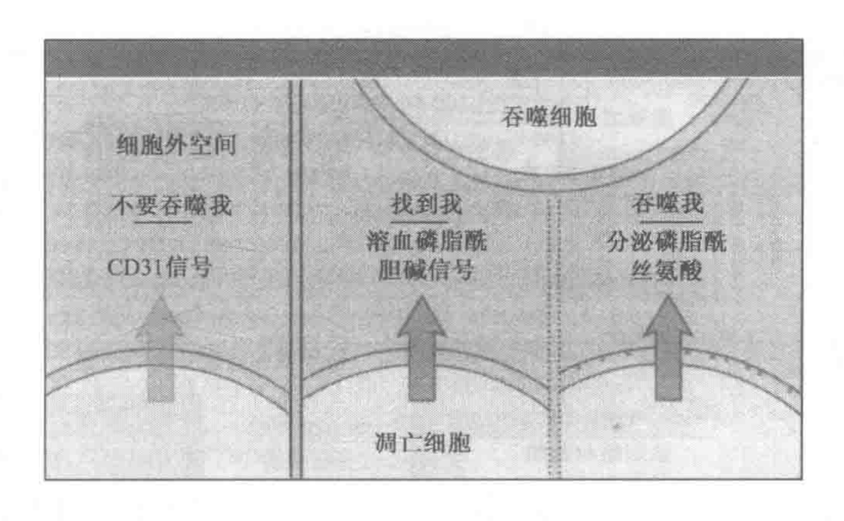


图 12.28　当细胞发生凋亡时，它们会产生“发现自己”的信号，如溶血磷脂酰胆碱，也会下调“不要吞噬自己”的信号，如 CD31，同时它们还表达“吞噬自己”的信号，如磷脂酰丝氨酸外翻。这样的结果就是，死亡细胞很快地就被“专业的”吞噬细胞（如巨噬细胞）或其他细胞（如上皮细胞）所吞噬。

为两个互补组（complementation group）。第一组基因包括 *ced-1*，*ced-6* 和 *ced-7*，它们在早期的识别和传递信号中发挥作用。第二组基因包括 *ced-2*，*ced-5*，*ced-10* 和 *ced-12*，它们可能是参与吞噬器的形成而不是识别作用。所有这些基因都在吞噬过程中发挥作用，它们能影响吞噬细胞识别和吞噬死亡细胞的能力，而 *ced-7* 似乎也在死亡细胞中发挥作用。

CED-1 可能是一种受体，它能够对凋亡细胞的细胞膜变化做出反应。CED-1 与哺乳动物细胞中被称为清道夫受体（scavenger receptor）的一类受体相关。哺乳动物的清道夫受体中有两种可以促进培养中的哺乳动物吞噬细胞去吞噬凋亡细胞，这两种受体分别是 SREC（scavenger receptor expressed by endothelial cell）和 CD91。在果蝇体内发现的唯一一个促进清除凋亡细胞的基因被命名为 *croquemort*，它也是清道夫受体家族的成员之一。

对哺乳动物细胞所进行的研究表明，死亡细胞中一个关键的“吞噬自己”的信号就是外翻的磷脂酰丝氨酸，当效应 caspases 的作用引起细胞质膜的混杂挤压（scramble）时，就会发生磷脂酰丝氨酸外翻。图 12.29 显示磷脂酰丝氨酸在正常情况下是依靠一种 ATP 依赖的“翻转酶”（ATP-dependent “flippase”）定位于质膜的内侧，这种翻转酶会使磷脂（phosphalipid）从质膜的外侧翻转（flip）到内侧（“flip”这个词特指脂类从外到内的移位。在有关凋亡的文献中，flip 通常被误用来指磷脂酰丝氨酸的暴露。从技术的角度讲，磷脂酰丝氨酸的暴露应该是“flop”）。如果这种移位酶失活（比如说，由于 ATP 被消除），磷脂酰丝氨酸会缓慢地出现在细胞表面；然而，在细胞凋亡过程中，磷脂酰丝氨酸的外翻则是快速发生的，并且是通过活化脂类分子的相互挤压（scrambling），以一种 caspases 依赖型的方式发生的。研究人员已经发现了一种磷脂 scramblase，它可被钙离子活化，但是它是否参与细胞凋亡还不清楚，而如果参与，它是如何被 caspasess 所活化的也不清楚。

秀丽新小杆线虫的 CED-7 在这方面很有趣，因为它不仅在吞噬细胞中发挥作用，

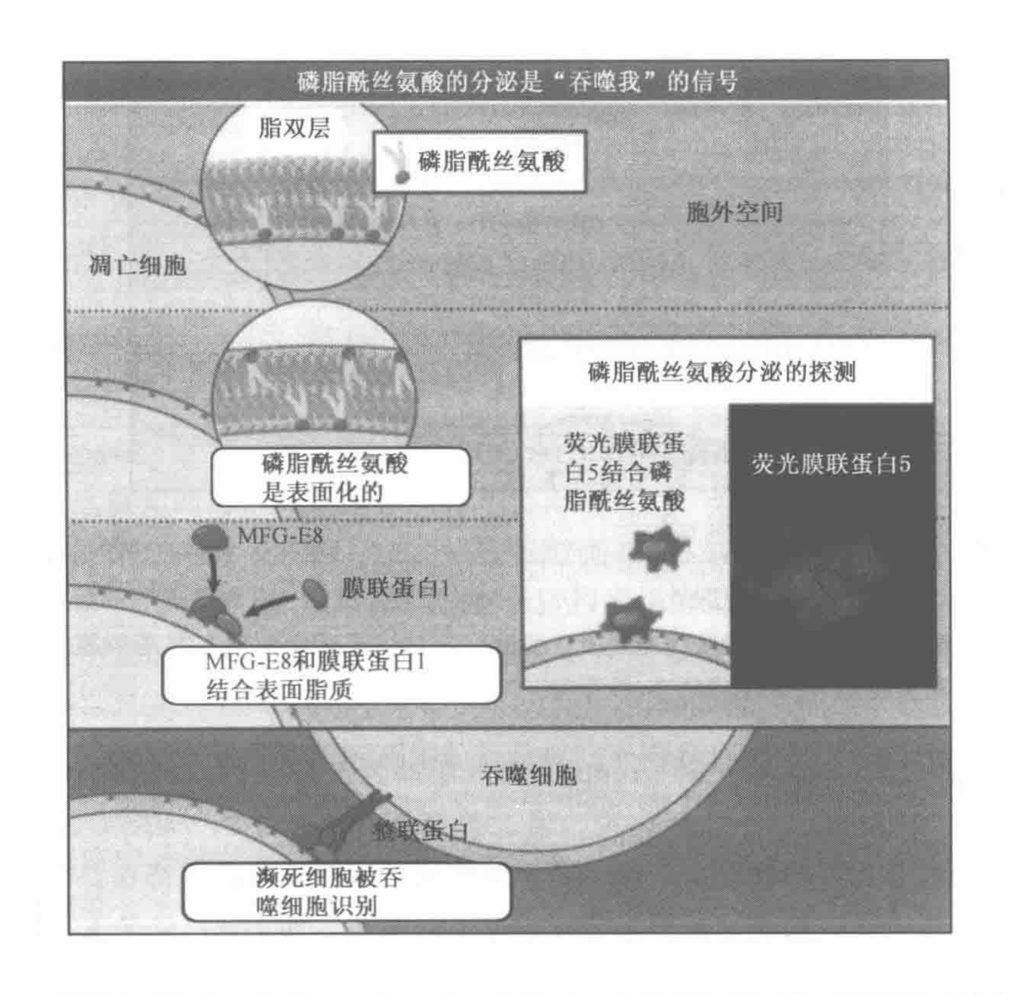


图 12.29　在凋亡过程中，细胞质膜争夺其脂类分子，这样就使得正常情况下处于内侧的磷脂酰丝氨酸出现在了外侧。位于外侧的磷脂酰丝氨酸会被诸如膜联蛋白Ⅰ和 MFG-E8 此类的蛋白质结合，这些蛋白质相应地又可以和吞噬细胞相结合，这样吞噬细胞就可以吞噬凋亡细胞了。可以利用荧光标记的膜联蛋白Ⅴ来检测磷脂酰丝氨酸外翻。照片显示的是用膜联蛋白染色的凋亡细胞。照片由 St. Jude 儿童医院的 Joshua C. Goldstein 和 Douglas R. Green 惠赠。

也在死亡细胞中发挥作用。在哺乳动物中，CED-7 的同系物是 ABCA1，这个蛋白质在质膜上参与了脂类重组，而且据称，ABCA1 在哺乳动物细胞的磷脂酰丝氨酸外翻中发挥了重要的作用。然而，最近的研究表明，秀丽新小杆线虫的 CED-7 并没有涉及磷脂酰丝氨酸外翻。

哺乳动物细胞表面的磷脂酰丝氨酸可以结合一些可溶性分子，这些可溶性分子能够作为连接吞噬细胞的桥梁。MFG-E8 就是这种可溶性分子中的一种，它存在于动物体的细胞外液中。MFG-E8 不仅可以结合死亡细胞上的磷脂酰丝氨酸，也可以结合吞噬细胞上的整合素受体。缺乏 MFG-E8 的小鼠在凋亡细胞的清除方面显示出了明显的缺陷。

利用与荧光染料相耦联的磷脂酰丝氨酸结合蛋白——膜联蛋白Ⅴ可以很容易地检测到凋亡细胞所发生的磷脂酰丝氨酸外翻（见图 12.29）。膜联蛋白Ⅴ在细胞凋亡中并不起作用（它只是研究中的一种工具），但另一个相关蛋白——膜联蛋白Ⅰ则可能会有利于吞噬细胞对凋亡细胞的识别。

哺乳动物还存在其他清除凋亡细胞的机制，而且在一些情况下，这些机制还显得很

重要。MER 是一种具酪氨酸激酶活性的受体，在体外培养条件下，来源于缺乏 MER 的小鼠的吞噬细胞在清除凋亡细胞方面存在缺陷。而且，这些缺陷小鼠会积累凋亡细胞，还不清楚 MER 是如何在其中发挥作用的。

健康的细胞也能表达“吞噬自己”的信号，例如高浓度的钙就能诱导磷脂的相互争夺从而短暂地使磷脂酰丝氨酸发生外翻。然而，这些细胞却并没有被清除，因为健康细胞还会表达“不要吞噬自己”的信号，这个信号在细胞发生凋亡时可能会失活。CD31 就是这样一种“不要吞噬自己”的信号，它既存在于吞噬细胞中也存在于大多数的健康细胞中。CD31 分子自身间的相互作用可以抑制表达“吞噬自己”信号的健康细胞被清除掉。

当细胞发生凋亡时，它们可以通过产生“发现自己”的信号来主动地募集诸如巨噬细胞此类“专业的”吞噬细胞。由活化的磷脂酶 A（phospholipase A）参与形成的溶血磷脂酰胆碱（lysophosphatidylcholine）就是一种“发现自己”的信号。效应 caspasess 可以通过裂解来活化磷脂酶 A。这样，凋亡细胞就可以增加它们被发现并被有效从体内清除的可能性。

12.20 细胞凋亡在诸如病毒感染和癌症等疾病中发挥作用

关键概念

- **在病毒感染或癌症的情况下，凋亡通路可能会被阻断。**

病毒必须寄生在细胞内，所以宿主细胞的死亡是清除病毒感染的一种策略。出于这个原因，为了自身的利益，病毒就需要保持宿主细胞存活。很多病毒通过抑制细胞凋亡来实现这一目的，而当我们考虑到细胞死亡通路在这种背景下很重要时，病毒这样做的方式就显得很有意义了。

如上所述，昆虫细胞的凋亡受到 IAP 的调控，这种调控是是通过 IAP 影响 caspases 的活化来实现的。昆虫杆状病毒就是通过表达一种可以抑制 DRONC 和效应 caspases 的 IAP 来阻止细胞凋亡的发生。此外，这些病毒还表达其他蛋白，如 p35 蛋白，它可以结合并抑制 caspases 的活性。通过抑制 caspases 的活化，这些病毒可以保持宿主细胞的生存直到产生足够量的病毒，这时细胞就会裂解。

通常，脊椎动物细胞中的病毒不采用上述方式，因为 caspases 的抑制并不能阻止线粒体外膜通透化的发生，也不能阻止不依赖于 caspases 的细胞死亡（而且还有可能增强了细胞对病毒的免疫反应）。一些脊椎动物的病毒可产生抗凋亡的 Bcl-2 蛋白，如腺病毒 E1B19K 蛋白和 Epstein-Barr 病毒 BHRF 蛋白。这些及其他的病毒 Bcl-2 蛋白可以阻止线粒体外膜通透化和细胞凋亡。

脊椎动物细胞中的病毒通常也会抑制由免疫效应细胞引起的细胞凋亡。例如，Pox 病毒可以产生一种蛋白酶抑制剂，它被称为 serpins，即丝氨酸蛋白酶抑制因子（serine protease inhibitors，serpsins），serpins 能够抑制粒酶 B 以及 caspases-8 的活性（但是不能有效地抑制 caspases-9 和效应 caspases 的活性）。通过抑制粒酶 B，病毒可以逃脱细胞毒淋巴细胞的凋亡诱导效应。细胞毒淋巴细胞负责监察病毒感染的细胞。相似的，对 caspases-8 的抑制作用可以阻止由死亡配体结合其受体所诱导的凋亡；这

些死亡配体通常是由细胞毒淋巴细胞以及其他能对病毒感染做出反应的细胞产生的。病毒阻止死亡受体通路的另一条途径就是表达与 c-FLIP 相关的分子，如疱疹病毒产生的 v-FLIP。

另一种与颠覆细胞凋亡机制相关的疾病就是癌症。在本章开始我们就提到了，强效抑癌基因 p53 在大约 50%的人类癌症中都发生了突变，p53 能够施加其抑癌效应的部分原因在于它可以诱导转化细胞的凋亡。相似的，抗凋亡的 Bcl-2 蛋白最初是作为滤泡 B 细胞淋巴瘤（follicular B cell lymphomas）中染色体易位的一个断裂点被发现的。癌症涉及细胞凋亡调控的改变。

但是，癌症和细胞凋亡之间的关系不仅仅只是这些简单的相关性。脊椎动物细胞对于那些使它们进入细胞周期的信号所引起的凋亡很敏感，它们是生是死取决于周围组织向细胞传递的生存信号（例如通过生长因子）。这些因子受到限制时，正在周期运转中的细胞就会发生凋亡，这就限制了组织的扩张。例如，图 12.30 显示 c-Myc 蛋白不仅可以促进细胞增殖也可以促进细胞凋亡。因此，在组织中单纯表达 c-Myc 并不一定会促进组织的扩张（或癌症），除非还存在其他的生存信号。细胞周期和细胞凋亡之间的这个基本关系是为何我们能以具有较大体积的、较长生存时间的多细胞生物存在而又不会普遍出现癌症的基础所在。并不是细胞周期导致细胞凋亡，而是促进细胞进入细胞周期的分子同样可以诱导细胞凋亡，这种凋亡又可以被抗凋亡信号所抑制。

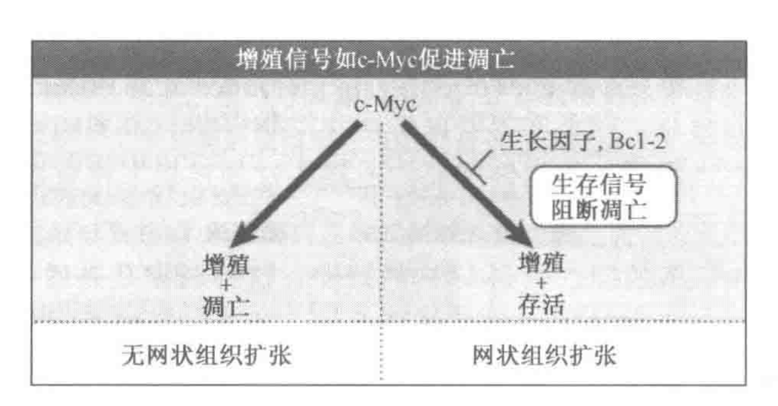


图 12.30　c-Myc 和相关信号不仅可以驱使细胞进入细胞周期还可以使细胞对凋亡敏感。所以，在没有其他信号存在的情况下，不会发生组织的净扩张（net tissue expansion）。当细胞凋亡被抑制时，如被生长因子所抑制，细胞数量会增加。c-Myc 使细胞对凋亡敏感的能力是这个蛋白质的基本特性，而不是参与细胞周期调节的副作用。诸如这样的机制在维持有机体的自身稳定和肿瘤的预防中处于中心地位。

尽管 c-Myc 既可以促进细胞增殖又可以促进细胞调亡，但是 Bcl-2 或 Bcl-xL 可以和 c-Myc 共同作用，通过抑制细胞凋亡来促进致癌作用。事实上，在人类癌症中，抗凋亡的 Bcl-2 家族成员经常发生上调。两类原癌基因（促凋亡、促增殖的和抗凋亡的）之间的相互合作可能是癌症中的一个共同原则。通常，原癌基因可以像 Myc（既促进增殖又促进凋亡），也可以像 Bcl-2（抑制凋亡但不促进增殖），又可以两者都像（在多重信号的作用下，既抑制凋亡又促进增殖）。Ras 蛋白以其活性形式可以参与不同的信号通路，这些信号通路可以导致这两个结果的产生。因此，Ras 蛋白在不同的条件下可以促

进凋亡也可以抑制凋亡。

12.21 凋亡细胞仅仅是离开但并没有被遗忘

关键概念

- 摄入和清除凋亡细胞的会对免疫系统产生持续性效应。

如本章开始所提及，细胞坏死和细胞凋亡之间的一个重要区别就是：坏死会引起主动的炎症反应，而凋亡一般则不会。但是，对凋亡细胞的清除并不仅仅是“悄无声息的”；对凋亡细胞的摄入（uptake）可以有效抑制炎症和免疫反应。例如，对凋亡细胞的摄入能够抑制可诱导的NO合酶的产生，NO合酶可以催化产生NO，而NO是参与炎症反应的重要信号分子。

而且，树突细胞（对于T淋巴细胞，是关键的抗原呈递细胞）对凋亡细胞的摄入可以导致相关抗原以一种能诱导免疫耐受性的方式被呈递。本质上说，就是免疫系统受到指示，不会对凋亡细胞相关抗原产生持久的免疫记忆。现在一些关于免疫功能的理论认为，上述机制是免疫系统进行自我耐受的一种重要的机制。研究人员正在对使用凋亡细胞来“诱骗”免疫系统对抗原产生耐受性进行研究，希望能用于实践的目的。

不能有效地清除凋亡细胞可能是系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosis，SLE）的基础所在，它是一种自身免疫性疾病，其特点就是血清出现多种针对细胞内抗原的自身抗体（包括核蛋白抗体和双链DNA抗体）。系统性红斑狼疮的一个诊断特征就是在循环系统中出现了LE body。LE body是凋亡细胞，它们要么是处于自由状态，要么是被血液中的吞噬细胞所吞噬。因缺乏MFG-E8或MER，从而在凋亡细胞的清除方面存在缺陷的小鼠会得一种疾病，这种疾病在很多方面都与SLE相似。

12.22 展望

预测“接下来会怎么样”是很难的。就像一位哲人所说的：“预见很难，未来在不断变化中”尽管预言往往并不是科学的，但我们可以目前的研究为基础，去推测那些对于我们目前还不理解的细胞死亡方面的问题。但是，请记住，使生命科学如此有趣的条件之一就是它的不可预测性。记住了这些话，我们再来看一下细胞死亡研究的未来。

尽管细胞凋亡的两条中心通路已经得到了详细的阐述，但几乎可以肯定还有更多的凋亡通路。Caspases-2是一种起始caspase，它会和接头分子RAIDD结合并被活化（另一个分子PIDD也在caspases-2的活化中发挥作用）。然而，尽管已经有了一些线索，我们几乎不知道这个推断的通路是如何或是何时被活化的。Caspases-2可能会参与由热休克引起的，或是由细胞的新陈代谢变化引起的，一些情况下还可以是由DNA损伤引起的细胞凋亡。相似的，我们几乎不了解caspases-4的活化以及它在凋亡和炎症中所起的作用。相比之下，尽管我们对于caspases-8的活化以及它在细胞凋亡中的作用了解得很多，但我们却不知道caspases-8和它的伴侣分子FADD及c-FLIP是如何促进发育的

(如前所示，敲除这些基因在早期胚胎发育中是致死的)。

并不是所有主动的细胞死亡都是细胞凋亡。一些类型的细胞坏死也是受到生物学调控的，并且不仅仅是由于随机损伤引起的。最近，研究人员正关注于另一种形式的细胞死亡，它与自吞噬过程相伴随。自吞噬作用见于所有的真核生物，被认为主要是在缺乏营养时短期用来产生能量以保证生存的机制。目前，我们不知道“自吞噬的细胞死亡”是否是由自吞噬作用引起的，还是由其他因素引起。

接下来几年里，研究人员将对核心凋亡通路和细胞中其他重要事件之间的关系进行更深入的分析。来自细胞周期的信号、细胞骨架、修复途径、胁迫通路、钙及其他离子、新陈代谢的变化以及其他因素都会毫无疑问地影响凋亡通路的组成元素，但我们对这些信号和它们在凋亡中的作用靶点还知之甚少。

相似的，细胞中维持生存的信号也是很重要的，需要我们更好地理解。抑制细胞凋亡的信号通路对于组织的正常发育是至关重要的，如果出了错，就会导致不必要的组织增生甚至导致癌症。尽管我们已经了解了许多这样的生存机制，但它们抑制凋亡通路的精确途径还需要深入研究。

对于细胞凋亡，我们还有很多需要学习，但我们也已经理解了许多内容，就像本章所证明的那样。尽管如此，但我们所掌握的关于细胞凋亡的知识还不能有效地抗击疾病。目前，caspases 的抑制剂正用于临床实验，来抑制一些组织损伤情况下的细胞凋亡。最终，Bax 和 Bak 的抑制剂可能会作为药剂来阻止在这个过程早期时（并且是可恢复的）发生的不需要的细胞死亡。与此相反，抗凋亡 Bcl-2 蛋白的抑制剂正作为抗癌作用物在进行研究，它在癌症治疗上具有一定的前景。相似的，IAP 的抑制药物被用于促进肿瘤细胞中 caspases 的活化，而且也显示出一定的效果（尽管在这一点上，我们还不知道它们是否起到了如人们所料的作用。）

关于细胞死亡研究的未来的预测，有一点是可以肯定的，那就是这个领域将依然会非常有趣。

12.23 总结

细胞凋亡是动物体内的一种细胞死亡方式，它在机体的正常发育、保持自身稳定以及诸如病毒感染和癌症等疾病中发挥重要作用。在凋亡过程中，细胞是“包裹着”被吞噬细胞快速清除的，这涉及了一系列被称为 caspases 的蛋白酶的作用。通过一条或多条凋亡通路的参与，caspases 被活化。在哺乳动物体内，两条被详细阐述的凋亡通路分别是外部的死亡受体通路和内部的线粒体通路。在死亡受体通路中，特异性死亡受体（TNF 受体家族的一个亚家族中的一员）的配体会诱导 caspases-8 发生二聚化并使 caspases-8 被活化，而活化的 caspases-8 会接着裂解并激活效应 caspases-3 和 caspases-7，从而调控细胞的凋亡。在线粒体通路中，Bcl-2 家族的蛋白相互作用从而最终导致线粒体外膜被破坏，释放蛋白质到细胞质中。细胞色素 c 一旦释放出来，就会与 APAF-1 相互作用并使之发生寡聚化，接着，寡聚化的 APAF-1 会结合并活化 caspases-9。而活化的 caspases-9 又会去裂解并活化效应 caspases-3 和 caspases-7，从而调控凋亡。

参考文献

12.1 导言

综述

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* v. 26 p. 239–257.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* v. 68 p. 251–306.

12.2 Caspases通过裂解特异性底物调控细胞凋亡

综述

Fischer, U., Jänicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K., 2003. Many cuts to ruin: A comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* v. 10 p. 76–100.

12.3 效应caspases通过裂解而被活化，起始caspases通过二聚化而被活化

综述

Boatright, K. M., and Salvesen, G. S., 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 15 p. 725–731.

Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G. S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* v. 384 p. 201–232.

Lahm, A., Paradisi, A., Green, D. R., and Melino, G., 2003. Death fold domain interaction in apoptosis. *Cell Death Differ.* v. 10 p. 10–12.

研究

Berglund, H., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., Mcdonald, N. Q., Driscoll, P.C. 2000. The Three-Dimensional Solution Structure and Dynamic Properties of the Human Fadd Death Domain. *J. Mol. Biol.* v. 302 p. 171–188.

Boatright, K. M., et al., 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* v. 11 p. 529–541.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Fesik, S. W. 1996. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* v. 384 p. 638–641.

Riedl, S. J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G. S., and Bode, W., 2001. Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 14790–14795.

Vaughn, D. E., Rodriguez, J., Lazebnik, Y., Joshua-Tor, L., 1999. Crystal structure of Apaf-1 caspase recruitment domain: An alpha-helical Greek key fold for apoptotic signaling. *J. Mol. Biol.* v. 293 p. 439–447.

12.4 一些凋亡蛋白抑制因子(IAP)对caspases的阻抑作用

综述

Shi, Y., 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Sci.* v. 13 p. 1979–1987.

Vaux, D. L., and Silke, J., 2005. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 287–297.

12.5 一些caspases在炎症反应中发挥作用

综述

Martinon, F., and Tschopp, J., 2004. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* v. 117 p. 561–574.

12.6 细胞凋亡的死亡受体通路呈递外部信号

综述

Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J., 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* v. 27 p. 19–26.

12.7 TNFR1介导的凋亡信号具有复杂性

综述

Aggarwal, B. B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* v. 3 p. 745–756.

研究

Barnhart, B. C., and Peter, M. E., 2003. The TNF receptor 1: A split personality complex. *Cell* v. 114 p. 148–150.

12.8 细胞凋亡的线粒体通路

综述

Green, D. R., 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* v. 102 p. 1–4.

12.9 Bcl-2家族蛋白可介导并调控MOMP以及细胞凋亡

研究

Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J.W. 2003. The structure of a Bcl-xl/Bim fragment complex: Implications for Bim function. *Immunity*

v. 19 p. 341–352.
Suzuki, M.,Youle, R. J., and Tjandra, N. 2000. Structure of Bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* v. 103 p. 645–654.
McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J., and Cowburn, D. 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: A structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* v. 96 p. 625–634.

12.11 Bax和Bak的活化受到其他Bcl-2家族蛋白的调控

综述
Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J., 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* v. 116 p. 205–219.

12.12 通过MOMP释放的细胞色素c诱导caspase的活化

综述
Hill, M. M., Adrain, C., and Martin, S. J., 2003. Portrait of a killer: The mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol. Interv.* v. 3 p. 19–26.

研究
Bao, Q., Riedl, S. J., and Shi, Y., 2005. Structure of Apaf-1 in the auto-inhibited form: A critical role for ADP. *Cell Cycle* v. 4 p. 1001–1003.

12.15 MOMP可引起caspase非依赖的细胞死亡

综述
Chipuk, J. E., and Green, D. R., 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 268–275.

12.16 线粒体通透性的转变可以导致MOMP

综述
Halestrap, A., 2005. Biochemistry: A pore way to die. *Nature* v. 434 p. 578–579.

12.17 很多关于细胞凋亡的发现都是在线虫中取得的

综述
Kinchen, J. M., and Hengartner, M. O., 2005. Tales of cannibalism, suicide, and murder: Programmed cell death in *C. elegans*. *Curr. Top. Dev. Biol.* v. 65 p. 1–45.

12.18 昆虫细胞的凋亡与哺乳动物和线虫有所不同

综述
Hay, B. A., Huh, J. R., and Guo, M., 2004. The genetics of cell death: Approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* v. 5 p. 911–922.

12.19 凋亡细胞的清除需要细胞间的相互作用

综述
Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., and Wesselborg, S., 2004. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol. Cell* v. 14 p. 277–287.
Reddien, P. W., and Horvitz, H. R., 2004. The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 20 p. 193–221.

12.20 细胞凋亡在诸如病毒感染和癌症等疾病中发挥作用

综述
Clem, R. J., 2005. The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 289 p. 113–129.
Green, D. R., and Evan, G. I., 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell* v. 1 p. 19–30.
Polster, B. M., Pevsner, J., and Hardwick, J. M., 2004. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1644 p. 211–227.

12.21 凋亡细胞仅仅是离开但并没有被遗忘

综述
Munoz, L. E., Gaipl, U. S., Franz, S., Sheriff, A., Voll, R. E., Kalden, J. R., and Herrmann, M., 2005. SLE—a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)* v. 44 p. 1101–1107.
Skoberne, M., Beignon, A. S., Larsson, M., and Bhardwaj, N., 2005. Apoptotic cells at the crossroads of tolerance and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 289 p. 259–292.

孙 晟 张 伟 译

第 13 章　癌症——原理和概述

Robert A. Weinberg
Whitehead Institute for Biomedical Research and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA

本章概要

13.1　肿瘤是由单个细胞衍生出来的细胞团

关键概念

- 癌症是从单个的突变细胞发展为肿瘤，然后再发生转移（metastasis）。
- 肿瘤是无性繁殖系。
- 肿瘤根据细胞类型分类。

癌症是指机体内细胞在不恰当的时间和地点进行增殖的一种疾病。当细胞获得突变使之丧失对分裂的调控时，就会成倍地增殖形成细胞团，我们称之为**肿瘤（tumor）**。**良性肿瘤（benign tumor）**不具有侵润性（noninvasive），也不影响其他组织，而**恶性**肿瘤（malignant tumor）却沿着一条破坏性的道路发展。肿瘤的生长伴随着新血管的生成，这些新生长的血管给肿瘤供应养分，这个过程称为**血管生成作用（angiogenesis）**。最后，恶性肿瘤细胞还能够脱离最初的附着部位，到其他部位黏着并增殖，这个过程称为**转移（metastasis）**。图 13.1 显示了这个进展过程。

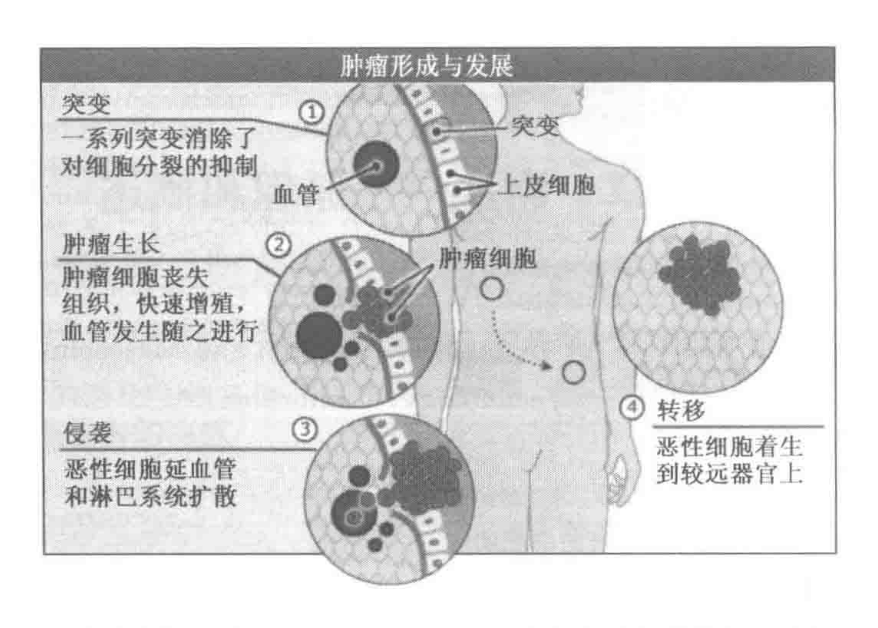


图 13.1 通常，癌症是从一个局部的肿瘤发展成为分布广泛的转移灶。这里，我们展示了一个上皮细胞发生突变后所经历的基本步骤。

一个肿瘤中的所有畸形生长细胞都代表一个**单克隆（monoclonal）**衍生物，因为这些细胞都来源于同一个祖细胞（progenitor cell）。这个祖细胞保持了其最初的损伤，而这个最初的损伤则驱使细胞向与恶性相关的畸形生长发展。尽管可能在损伤发生几十年后才能检测出肿瘤，但我们可以推断，这个祖细胞的后代会继续显示出许多最初是从那个祖细胞传承下来的畸变。因此，如果我们能对这个共同的祖细胞中的畸变进行分类，那么我们就能了解很多关于其后代行为的知识，并进而预测肿瘤作为一个整体的聚集特性（aggregate property）。从这种角度看，癌症是细胞的疾病。在临床中遇到的肿瘤，即使不是全部，也有很多特点是来自于其单个的组成细胞。

人体内有很多不同类型的细胞都可以形成肿瘤，每一种都有具自身特点的组织学表型和生物学行为。相应的，癌症会出现在 100 多个不同的组织部位，并且显示出广泛的、各不相同的特点。即使是一种已定的肿瘤类型中，在行为和生化特点上也存在很大的变异性。然而，尽管特定细胞类型所特有的性质会影响肿瘤的一些行为（如黑色素瘤的侵润性要比基底细胞癌更强），但所有的癌细胞都具有某些基本的特性，例如细胞生长和分裂失控。

根据这些不同的肿瘤或是异常的细胞团所起源的细胞类型，我们可以将肿瘤主要分为四种。在人体内，最常见的肿瘤就是**癌（carcinomas）**，它是由遍布在各种器官的腔面和表面的上皮细胞转化而来的；而最常见的癌有肺癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和皮肤癌。**肉瘤（sarcomas）**相对于癌则少见得多，它产生于由成纤维细胞和与其密切相关的细胞所组成的间充质组织中，骨骼和肌肉的肿瘤就属于这种类型。造血器官经常是癌变的目标，相关细胞的恶性转化会导致白血病、淋巴瘤、骨髓瘤和其他肿瘤（neoplasias）。**神经外胚层肿瘤**构成了肿瘤的第四种类型。图 13.2 显示的是 2005 年美国不同类型癌症发生率的推测。

癌症研究正从一门对各种各样的，表面上毫不相关的表型进行描述的科学快速发展为一门符合逻辑的科学，这样，我们就可以用一些基本的原理来合理地说明细胞和肿瘤

最新癌症病例与死亡率的推测(美国 2005 年)		
位点	新病例	死亡
所有位点	1 372 910	570 280
口腔 & 咽喉	29 370	7 320
消化系统	253 500	136 060
呼吸系统	184 800	168 140
软组织(包括心脏)	9 420	3 490
骨与关节	2 570	1 210
皮肤(包括基底 & 鳞状的)	66 000	10 590
乳房	212 930	40 870
生殖系统	321 050	59 920
泌尿系统	101 880	26 590
眼 & 眼窝	2 120	230
脑 & 其他神经系统	18 500	12 760
内分泌系统	27 650	2 370
淋巴瘤	63 740	20 610
多种骨髓瘤	15 980	11 300
白血病	34 810	22 570
其他 & 非特定的原发位点	28 590	46 250

图 13.2 各种类型的组织发生癌变的概率，疾病发展的进程以及治疗的效果都有很大的变异性。资料来源：美国癌症协会。

的行为。这一章就描述了这些原理以及这些原理是如何帮助我们合理地说明人类肿瘤复杂而又多变的行为。

13.2 癌细胞有很多表型特征

关键概念

- **癌细胞具有一些独特的特征。**
- **与正常细胞不同，癌细胞在培养皿（Petri dish）中培养时，当其接触到邻近细胞时不会停止分裂**
- **癌细胞对维持生长和增殖的生长因子的需求极度降低。**
- **与正常细胞不同，培养中的癌细胞不需要贴附在一个物理介质上即可生长，即具有锚定非依赖性（anchorage independence）的特点。**
- **培养中的正常细胞在经过一定的生长和分裂周期后就会停止分裂，而癌细胞不同，它是无限增殖的细胞，因此，癌细胞在经过预定的代次后不会停止分裂。**
- **癌细胞通常会发生染色体畸变，包括染色体数量和结构的变化。**

这些年来，研究人员已经对那些与癌细胞特异性相关的特性进行了分类。这些特性被概括在图 13.3 中。利用培养条件下使细胞增殖的方法（*in vitro*）可以很容易地去研究这些特性，而不是在活体组织中去研究它们（*in vivo*）。很多类型的癌细胞是易于在培养皿中进行培养的。很多类型的正常细胞则不同，它们更难以在体外生长（注意，培

养条件下生长的“正常”细胞会发生一些变化，从而促进它们在培养条件下生长，我们将在13.7肿瘤的发生是一个复杂的过程中讨论这些问题。)

培养的正常和癌变成纤维细胞的特性		
特点	正常细胞	癌变细胞
生长的接触抑制	存在	缺失
生长因子的需求	高	低
锚定依赖性	存在	缺失
细胞周期检验点	完备	缺失
染色体组图谱	正常	异常
增殖周期	有限	无限

图 13.3　癌细胞在很多特征上与正常细胞不同。

如果将正常细胞接入具营养介质的培养皿中，则它们会附着在培养皿的底部并开始增殖，直到覆盖了整个底部表面，这时它们就会停止生长。这种生长行为被命名为**接触抑制（contact inhibition）**，就是指当细胞互相接触的时候，它们就会停止自身的增殖。结果，这样的正常细胞就会形成一个单层细胞厚度的细胞片层，即**细胞单层（monolayer）**。当这个细胞层覆盖了整个培养皿的底部时，就称为一个汇合的单细胞层（confluent monolayer）。

与正常细胞相比，癌细胞的行为有很大的不同。图13.4显示的是，如果将癌细胞接种到培养皿中，这些细胞在发生相互接触后的很长一段时间里还会继续生长和分裂。无法停止分裂使癌细胞可以堆积性生长。在培养皿中，如果一个癌细胞在大量的正常细胞中生长，最终这个癌细胞和其后代会形成一个厚的细胞团，这个细胞团被称为病灶，在病灶周围会围绕着正常细胞所形成的细胞单层。甚至依靠肉眼就可以比较容易地对这些病灶计数。因此，癌症生物学家就能够在一个正常细胞群中轻松地确定转化的、癌变的细胞克隆数。

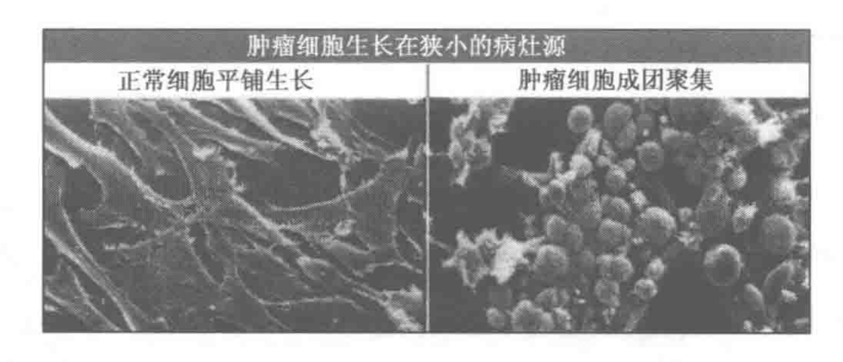


图 13.4　扫描电镜显示，正常细胞铺展开并排列成长形队列，而肿瘤细胞则聚拢成紧密的球状团块。照片由 California 大学（Berkeley）的 G. Steven Martin 惠赠。

丧失接触抑制并不是癌细胞唯一的生长特性。如果先将这些细胞置于悬浮液中，并与凝胶状琼脂糖培养基相混合，再接种到培养皿中，则这些细胞会形成圆形克隆。相比之下，正常细胞就不能在这种悬浮培养条件下生长；相反，它们只有牢牢地贴附在培养皿的底部才能开始增殖。因此，正常细胞是**锚定依赖型**的（anchorage dependent），而

癌细胞是锚定非依赖型的（anchorage independent）。

在体外条件下，最容易生长的细胞类型之一是一种结缔组织（connective tissue）中的细胞，称为成纤维细胞（fibroblast）。将成纤维细胞进行体外培养，每当它们完全融汇时就将它们传代到另一个培养皿中继续培养，这样它们就能够生长和分裂很多代，然后就会停止增殖。这暗示细胞分裂倍增的次数是有限的，一旦这一支系的细胞耗尽了分配给它们的生长-分裂周期次数，即使环境还适宜于继续增殖，细胞也依然会停止生长。我们观察到，根据细胞类型和供体器官的不同，细胞一般在30代、40代或50代后停止增殖，这个观察结果就表明了上述结论。图13.5显示了这方面的一个例子。相对于健康细胞有限的生长能力，癌细胞则表现出明显的差别。癌细胞一旦适应了培养环境，就会不受限制地增殖，因此，癌细胞被认为是**永生化**的（immortalized）。

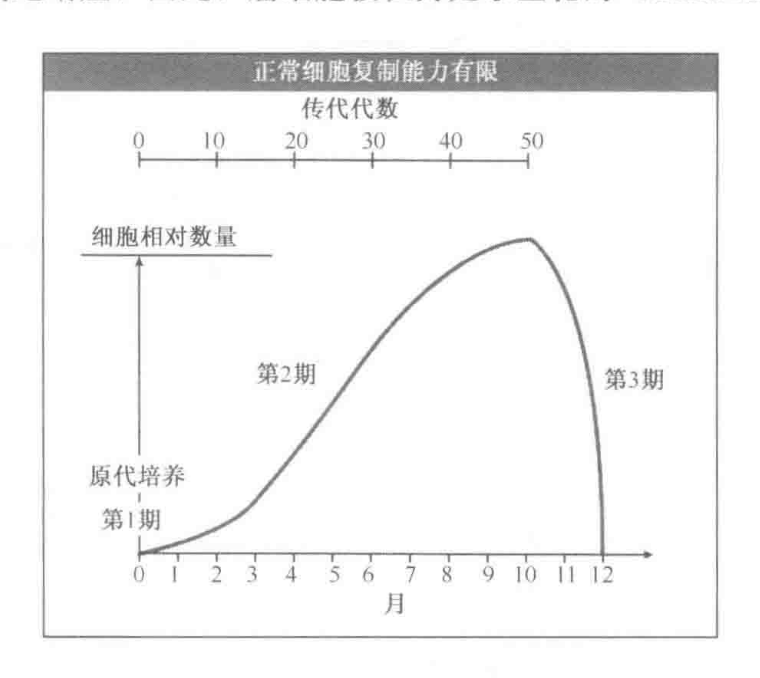


图13.5 在一个正常细胞群体中，细胞倍增30～40次后，就会停止增殖，细胞就进入衰老时期。修改自 *Exp. Cell Res.*, vol, 25, Hayflick, L., and P. S. Morrhead, The serial cultivation…pp. 585-621。

培养中的癌细胞还有其他的特性将它们与正常细胞区分开。正常细胞在体外培养时，它们所需要的培养基中不仅要含有必需的营养成分（氨基酸、葡萄糖和维生素），而且还必须含有牛血清。血清中含有大量的**生长因子（growth factor，GF）**，生长因子通常是由一个细胞分泌的用来刺激另一个细胞生长的蛋白质。

血小板衍生生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）是血清中的一种主要的生长因子，它是在组织受到损伤后发生的凝血过程中，由血小板释放到血清中的。通常，当位于损伤组织处的血小板释放出PDGF时，PDGF就会刺激周围的成纤维细胞生长，接着，这些成纤维细胞就会被诱导参与组织重建。相似的，组织培养基中PDGF的存在也是成纤维细胞在培养皿中生长所必需的；如果没有加入PDGF，这些细胞也能维持存活几周，但却不能生长和分裂。其他类型的生长因子，如表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF），是各种上皮细胞生长体外培养所必需的。图13.6显示了一个有代表性的生长因子信号通路。

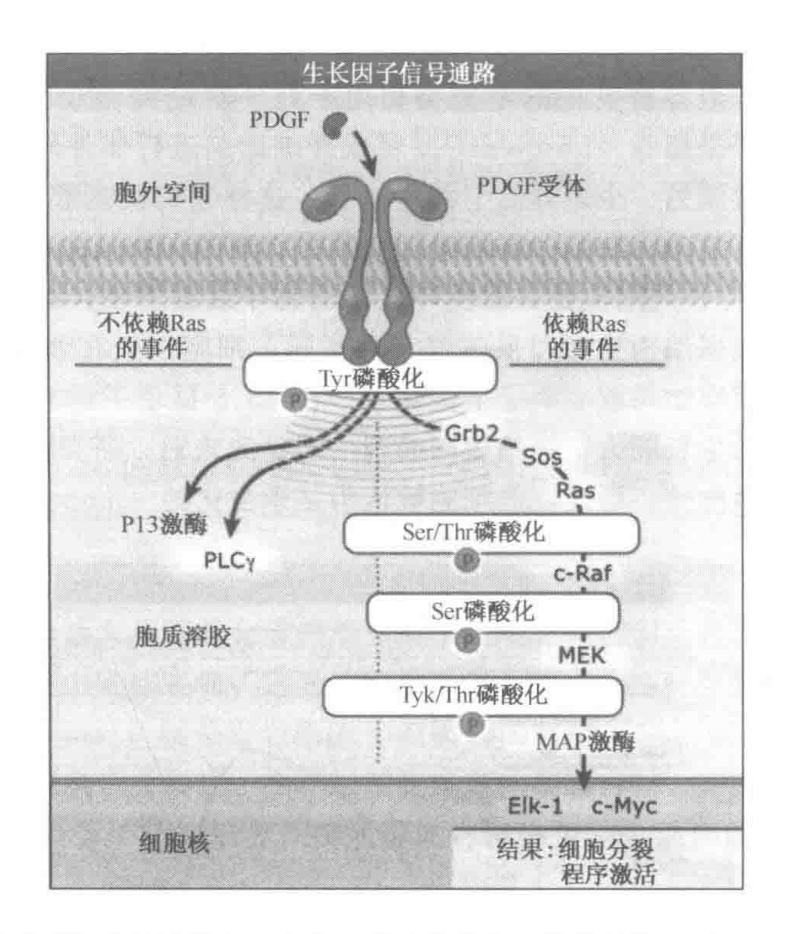


图 13.6 在一个典型的信号通路中，配体与其受体结合，活化细胞内的级联反应，导致细胞行为的变化。蛋白质磷酸化及脂类和 GTP 的水解是细胞内传递信号的主要手段。

事实上，所有的健康细胞都需要存在于培养基中的一种或多种生长因子的刺激，才能开始增殖。这就引出了一个重要的生物学观点，这种观点适于大多数种类的细胞：细胞是被外源性的刺激（尤其是周围环境中的生长因子所携带的信号）诱导后才进行增殖的。但癌细胞却不遵守这一普遍规则。与正常细胞相比，癌细胞生长所需要的生长因子的数量要少得多。癌细胞可以刺激自身的增殖，因此，它们的生长和分裂在很大程度上就不依赖于外源性的生长促进信号。

但重要的是，癌细胞也很少完全不依赖于外源性的生长刺激因子。它们通常也会继续依赖于某些生长因子，而这些生长因子是它们正常的祖细胞增殖所必需的。因此，大多数人类乳腺癌细胞依赖于雌激素来驱动它们的增殖，而前列腺癌细胞则依赖于雄激素（尽管这两种作用物通常被视为是“激素”，但它们实际上是起到了生长因子的作用，促使这些癌细胞的增殖）。此外，胰岛素样生长因子 1（insulin-like growth factor 1，IGF-1）是人类很多类型的癌细胞维持生存所必需的。

PDGF 和 EGF 是刺激生长的，还有一些类型的细胞外因子实际上是抑制增殖的。在这些生长抑制因子中，研究最透彻的是 TGF-β，可以有效抑制多种上皮细胞的增殖。实际上，TGF-β 就是作为生长的负调控因子在发挥作用（由于 TGF-β 可以诱导某些细胞产生锚定非依赖型生长，所以它最初被称为肿瘤“生长”因子）。癌细胞与正常细胞的不同之处还在于：很多类型的癌细胞可以抵抗 TGF-β 的抑制作用，即使在很高浓度的 TGF-β 存在的情况下，它们也能继续增殖。

所以，癌细胞与细胞外信号之间的关系发生了两个非常显著的变化。癌细胞相对不依赖于外源性的生长刺激因子，同时，它们对外源性的生长抑制因子也产生了抗性。这两个变化表明了癌细胞生物学的一个普遍性的主题：癌细胞不再与周围环境中的信号（尤其是生长促进因子和生长抑制因子）保持密切的联系。

癌细胞的另一个重要特征是细胞核中的染色体组通常会发生畸变，如一些染色体会丢失，其他一些染色体数量会增加，染色体的片段发生融合形成原本不存在的染色体。这种染色体异常被称为**非整倍性（aneuploidy）**，而正常细胞的染色体状态是**整倍性（euploidy）**的，两者之间有着显著的差异。图 13.7（见图版）是一个肿瘤细胞非整倍性的荧光原位杂交图像。

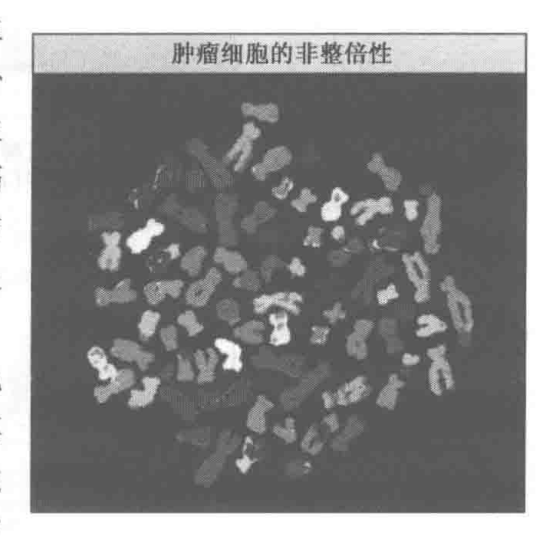


图 13.7　利用不同荧光染料标记的染色体特异性杂交探针，显示结肠癌细胞的染色体。可用于检测染色体结构和数目的缺陷。照片由 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心的 Prasad V. Jallepalli 惠赠。复制自 Jallepalli，P. V. and Lengauer，C. *Nature Review Cancer*. 2001. 1：109-117。

总之，癌细胞存在多种畸变，远不止上述的这些特征。然而需要牢记的是癌细胞和正常细胞也拥有很多共同特征，所以很难做到在不伤害健康细胞的同时去杀伤癌细胞。

13.3　癌细胞产生于 DNA 发生损伤后

关键概念

- 引起 DNA 损伤可能是致癌物作用的机制。
- 某些基因的突变引起细胞生长异常。
- Ames 设计了一个实验，可以用来检测化学试剂的致癌性。
- 癌症通常发生在体细胞中。

引起癌症的物质，如化学试剂或 X-射线都被称为**致癌物（carcinogen）**。很多致癌物是作为**诱变剂**来发挥效应的。致癌物会进入体内，攻击某个靶器官中的细胞，使这个细胞中的关键基因发生突变。这些突变的基因随后会影响这个细胞及其后代的行为，使之异常生长。

人们并不是一开始就认识到致癌作用和致突变作用之间的联系，Bruce Ames 在 1975 年所进行的工作强有力地推动了这方面的研究。Ames 发现，如果一种作用物的致突变能力越强，那么它作为一种强有力的致癌物的可能性就越大。图 13.8 是 Ames 实验的一个简化示意图，他用这个实验对各种各样已知的致癌物的致突变能力进行了定量研究。

图 13.9 显示的是，在绝大多数情况下，受到致癌物侵袭的细胞都是**体细胞**，即除卵巢（ovaries）产生的卵子的和睾丸（testes）产生的精子以外的其他所有类型的细胞。因此，由致突变的致癌物所产生的突变基因可以传给靶组织内部的其他细胞，但不能传

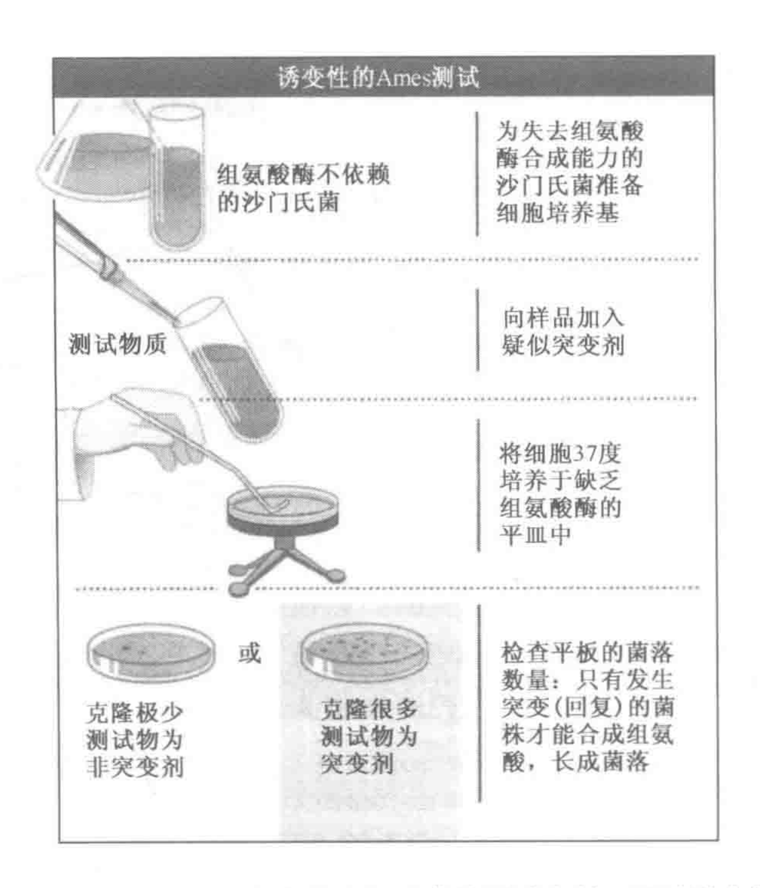


图 13.8 利用组氨酸基因发生突变的沙门氏菌检测诱变剂，通过诱变剂能够将突变的组氨酸基因转变为正常组氨酸基因的频率，来评价待测试化合物的致突变能力。图中显示的部分是添加大鼠肝提取物，其目的是通过执行一个生化反应，改变一种试剂的特性，激活其致突变的能力。

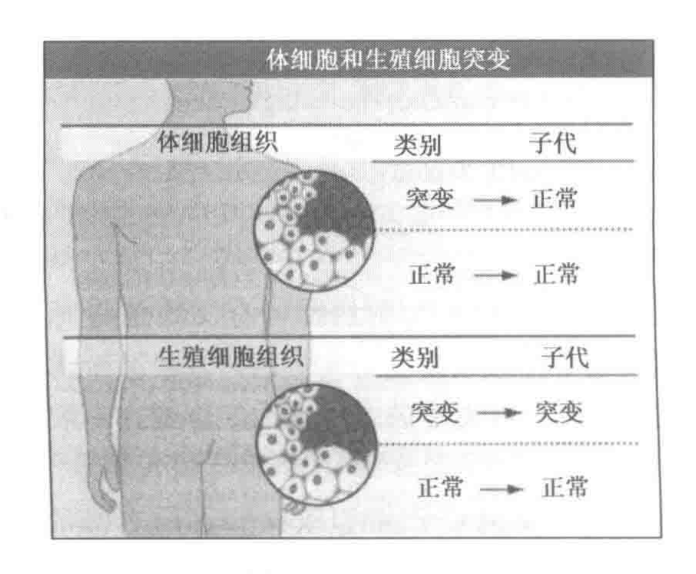


图 13.9 致癌物通常只攻击体细胞；因此，癌症只局限于个人而不会传递给后代。

给后代，因为卵子和精子中并不携带这个突变基因。这样的突变称为**体细胞突变**，它与**生殖系突变（germline mutation）**不同，生殖系突变是以可遗传的方式从一个有机体传递给它的后代。

因此，很多癌症是由于体细胞突变而引起的，这些体细胞突变会对整个机体的各个器官中的细胞产生不利影响。然而，我们将会发现，通过生殖传递的突变基因可能会使

后代对癌症具有先天的易感性。

13.4 当某些基因发生突变时就会产生癌细胞

关键概念

- 癌基因促进细胞生长和分裂。
- 抑癌基因抑制细胞生长和分裂。
- 细胞的基因组包含多种原癌基因。
- 肿瘤病毒携带有癌基因。
- 遗传学改变可以使原癌基因转变为有效力的癌基因。

当细胞接触到致突变物时，对细胞生长和增殖起到正调控和负调控作用的基因都有可能受到损伤。这两种类型的调控基因在正常情况下是以相反的方式发挥作用的，以确保有一个非常平衡的控制体系。起到促进正常细胞生长和分裂作用的正调控者被命名为**原癌基因（proto-oncogene）**；在发生突变后，这些基因会活化成为**癌基因（oncogene）**。在正常情况下，起到限制细胞增殖作用的负调控者被命名为**抑癌基因（tumor suppressor gene）**；当这些基因因为突变而失活，从而使细胞丧失生长抑制力时，它们就参与了致癌作用。

我们通过回顾历史，来阐明利用逆转录病毒（retrovirus）所进行的研究工作是如何导致癌基因被发现的。癌基因的发现要比抑癌基因早。这项研究最早可以追溯到Peyton Rous的工作上，他于1910年报道了一种从一个鸡翅膀的结缔组织肿瘤（肉瘤）中提取出来的病毒，这只鸡是长岛的一个养鸡场的农民带到他的实验室中的。Rous将这个肉瘤破碎，并过滤所获得的提取物，他发现有一种物质透过了滤膜，随后，他将这个物质注入另一只鸡，结果诱发了位于结缔组织的肉瘤。Rous重复了这个实验，他将从第二只鸡那里获得的肿瘤滤过提取物注入第三只鸡体内，结果这只鸡不久也在注射部位长出了肉瘤。由于这种物质可以通过滤膜并且可以增殖，而被定义为病毒而不是细菌（bacterium）（细菌的体积要比病毒大得多，这使得细菌会被截留在滤膜上）。

过了很长时间，人们才意识到Rous发现的病毒，被称为Rous肉瘤病毒（RSV），与其他大多数病毒明显不同，大多数病毒都是先侵入宿主细胞，然后增殖，接着再杀死细胞，从而释放出子代病毒颗粒，这些子代病毒颗粒再去感染其他细胞。而RSV并不会杀死被它感染的细胞，被RSV感染的细胞会迅速呈现出许多与癌细胞相关的特性，包括可以悬浮生长、细胞形状发生改变、**形成肿瘤（tumorigenic）**；换句话说，被感染的细胞发生了转化。

甚至，当最初被感染并发生转化的细胞生长和分裂时，它的子代细胞会继续显示出癌症的特点。RSV的基因组会存留在其子代细胞中，继续促进子代细胞的恶性生长。实际上，恶性生长已经具有一种可遗传的特征，能从一个细胞传到其后代，而这需要RSV的基因组持续存在于细胞中。

20世纪70年代初对RSV的研究表明，RSV是一种**逆转录病毒**，带有一个小的单链RNA。人们发现，一个被称为*src*的基因对RSV所有的致癌特性负责，正因为这个原因，*src*被视为一种癌基因。这个基因深远的影响力对于一些研究人员来说是不可思

议的，因为这个基因具有多效性，也就是说，它可以同时诱导细胞中的很多变化。这种变化范围使得被 RSV 感染并发生转化的细胞可以在鸡的结缔组织中增殖，最终导致肉瘤的产生。

在 1975 年，研究人员惊奇地发现，健康细胞也带有未突变的 *src* 基因，这种形式的 *src* 基因很明显在正常细胞和机体发育中起到了至关重要的作用。这种不具致癌作用的基因被称为**原癌基因（proto-oncogene）**，因为它可以看做是 RSV 携带的癌基因的前体。

很明显，*src* 基因之所以成为 RSV 基因组的一部分是由于一个自身缺乏 *src* 基因的 RSV 祖先感染了鸡细胞，并且复制了细胞 *src* 基因（有时被称为 c-*src*），又将这个复制本整合到自身的基因组中。获得了 *src* 基因的杂合体病毒就将这个基因转化成癌基因（v-*src*）。从此以后，形成的肿瘤病毒（现在实际上就是 RSV）就可以将被感染的细胞从正常生长状态转化为恶性生长状态。图 13.10 比较了 v-Src 蛋白和c-Src 蛋白。

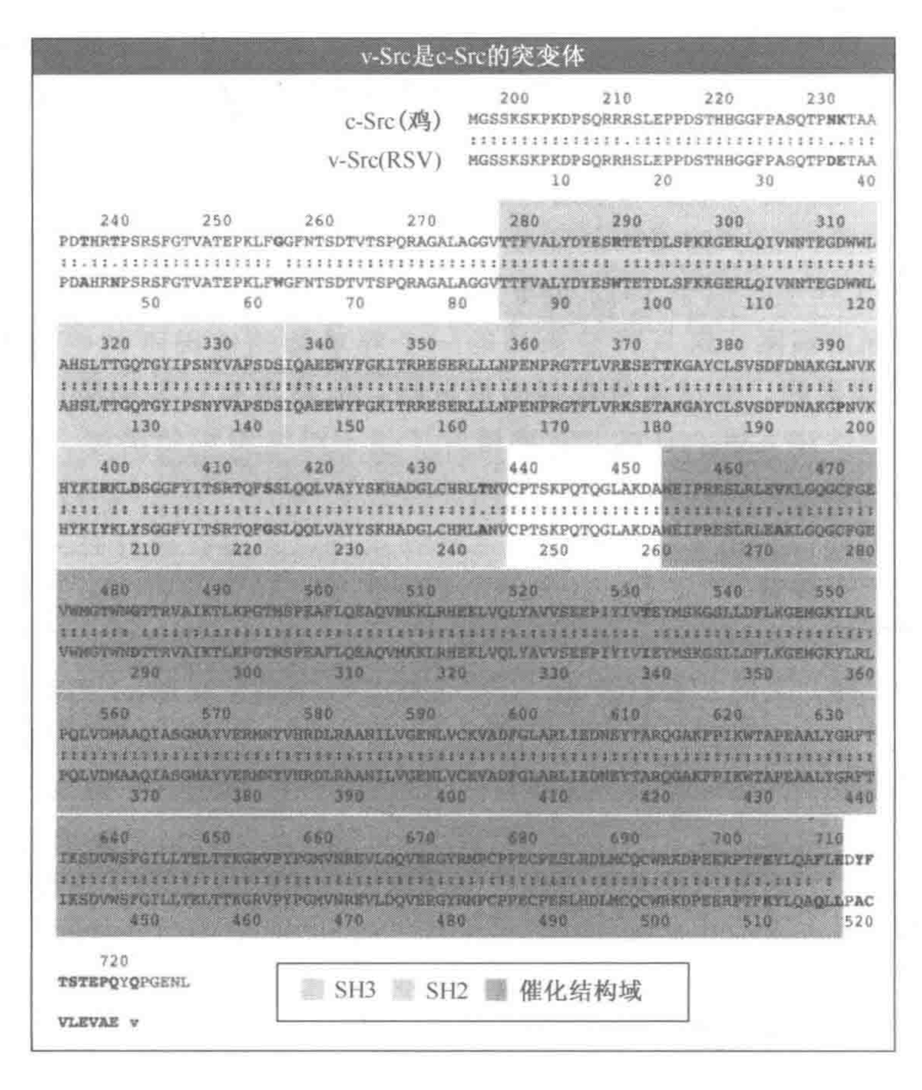


图 13.10　病毒 Src 蛋白和细胞 Src 蛋白的序列比较显示出这两种蛋白在一些氨基酸位点上是不同的。V-src 的序列信息来自于 *Cell*，vol. 40，Broom，s.，and Gilbert，W. *Rous sarcoma virus*…，pp. 881-890. C-src 的序列信息来自于 *Cell*，vol. 32，Takaya，T.，and Hanafusa，H. *Structure and sequence*…，pp. 881-890. 进行序列比较所利用的 FASTA 程序来自于 *Methods in Enzymology*，vol. 183，*Rapid and sensitive*…，pp. 63-98。

人们发现，很多其他的致癌逆转录病毒也都通过与 RSV 相类似的方式获得并改变了正常的细胞基因。禽骨髓细胞瘤病毒（avian myelocytomatosis virus）获得了 *myc* 基因；Harvey 大鼠肉瘤病毒（Harvey rat sarcoma virus）带有 H-*ras*；猫肉瘤病毒（feline sarcoma virus）带有 *fes* 癌基因。这些病毒相关的癌基因都来自于事先存在的正常的细胞原癌基因。事实上，动物的基因组中含有大量的原癌基因，它们的存在是通过发现在一种或另一种转化的逆转录病毒的基因组上含有它们的突变体而被揭示。

另一类与 RSV 不相关的肿瘤病毒通过一种完全不同的机制使宿主细胞发生转化。这类病毒的特点是含有双链 DNA。这类病毒包括：乳头瘤病毒（在兔子体内可以导致疣和恶性皮肤癌，在人体内可以导致宫颈癌）、SV40 和多瘤病毒（它们可以在啮齿类动物体内导致各种各样的肿瘤），此外还包括与疱疹病毒密切相关的病毒，如 Epstein-Barr 病毒（EBV）（它在非洲人群中可以导致淋巴癌，而在东南亚人群中可以导致鼻咽癌）。DNA 肿瘤病毒可以产生诱导癌症的蛋白，即**癌蛋白（oncoprotein）**，它与正常的细胞生长调控蛋白无关。相反，DNA 肿瘤病毒蛋白可以结合并干扰正常的细胞内蛋白。例如 SV40、腺病毒和乳头瘤病毒产生的蛋白都可以结合细胞内肿瘤抑制蛋白并使其失活，这种状态与由基因突变而导致的抑癌基因功能的丧失相类似。图 13.11（见图版）显示了病毒癌蛋白是如何与细胞内蛋白结合的。

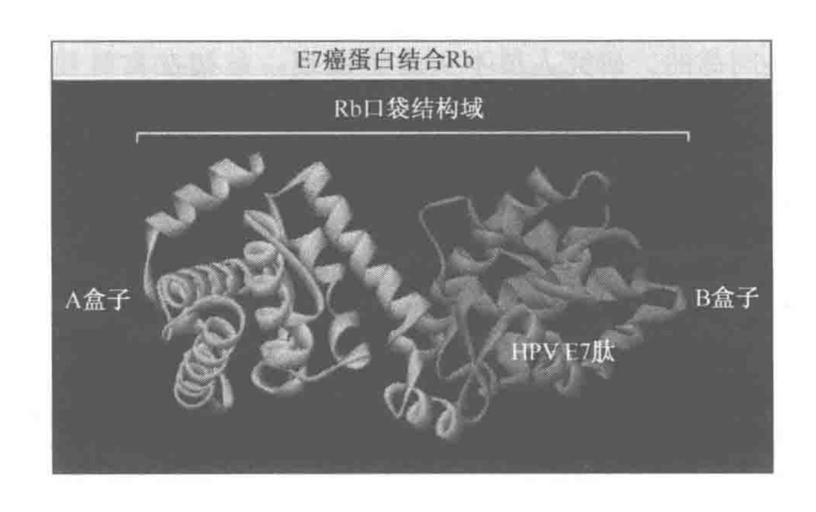


图 13.11　人类乳头瘤病毒（HPV）可以通过将 E7 肽（橙色）插入到 Rb 蛋白的口袋区（蓝色）中来干扰细胞周期调控，E7 肽的插入使 Rb 蛋白释放 E2F 转录因子。图像来自 Protein Data Bank file 1GUX。

从对肿瘤病毒所进行的研究中，我们得出三个观点，这三个观点对于我们对癌症分子起源的理解产生了深刻影响。第一，细胞基因组中包含了多种原癌基因。第二，遗传学改变，至少是由腺病毒引起的遗传学改变，可以使原癌基因转化为有效力的癌基因。第三，一旦这些基因转化为活化的癌基因，它们就能发挥多效作用，从而诱导出许多癌细胞的异常特性。此外，对 DNA 肿瘤病毒的研究帮助我们阐明了抑癌基因发挥作用的分子机制。

13.5 细胞基因组中包含有许多原癌基因

关键概念

- 功能获得性突变（gain-of-function mutation）可以激活原癌基因。
- 原癌基因的过表达可以导致肿瘤的发生。
- 易位（translocation）可以产生出具有致癌性的杂合蛋白。

人类很多的癌症并不是由逆转录病毒或 DNA 肿瘤病毒的感染所引起的。这就提出了一个问题：人类的癌细胞是如何获得癌基因并失去抑癌基因功能的。在 1979 年，研究人员发现，从化学致癌物转化的小鼠肿瘤细胞中提取的 DNA 可以被转移到正常细胞中（通过被称为**转染**的过程），而接受细胞也会发生转化。这说明化学致癌物转化的细胞所携带的癌基因与 RNA 肿瘤病毒以及 DNA 肿瘤病毒相关的癌基因很相似。然而，这些化学致癌物转化的细胞与病毒感染没有关联。这就说明：存在于化学致癌物转化的细胞中的癌基因是正常细胞原癌基因的突变形式，这种突变形式是由化学致癌物的致突变作用产生的，这种观点在几年内得到了证实（这个实验的细节，见 EXP：13-0001）。

事实上，由化学致癌物所激活的癌基因与 Kirsten 大鼠肉瘤病毒所携带的 Ki-*ras* 癌基因是密切相关的（Kirsten 大鼠肉瘤病毒是一种鼠类逆转录病毒）。相似的，通过转染人类膀胱癌细胞的 DNA 而检测到的一种癌基因事实上与 Harvey 大鼠肉瘤病毒所携带的 Ha-*ras* 癌基因是同源的。研究人员不久之后发现，最初在禽骨髓瘤病毒基因组中发现的 *myc* 基因的同源物也存在于各种人类造血细胞肿瘤中。

这些发现使我们得出一个清晰并且到目前为止十分明确的结论：原癌基因可以通过不同的机制被激活，成为癌基因。在一些动物中，原癌基因是通过整合到逆转录病毒的基因组中而被活化的。在非病毒感染引起的恶性转化中（如大多数发生在人类细胞中的恶性转化），相同的原癌基因是通过突变过程被激活的，这些突变可以改变位于细胞染色质上的正常基因。

在人类肿瘤中，负责使原癌基因活化成癌基因的突变是多种多样的。在 *ras* 癌基因中，可读框（reading frame）上的一个点突变（point mutation）就可以使原癌基因转化为癌基因。这个点突变是**功能获得性**突变，因为它使 Ras 蛋白被长期而不是瞬间锁定在生长刺激型的构型中。再以 *myc* 癌基因为例，在人类肿瘤中至少存在两种机制可以活化 *myc* 癌基因；导致 *myc* 癌基因形成的一些机制也会影响其表达的程度，因此也就导致其编码的 Myc 蛋白的水平提高。而在一些情况下，*myc* 基因的拷贝数会通过基因扩增（gene amplification）而增加。在其他一些情况下，*myc* 基因会通过**易位**（translocation）而融合到另一个基因中，如一种免疫球蛋白基因中；结果，在正常情况下以低水平表达并且受到很好控制的 *myc* 基因就会受到一种外来的转录启动子的刺激作用，它可以使 *myc* 基因高水平、连续地表达，使其表达失控。

染色体易位也可以通过与上述完全不同的机制来产生癌基因。一个很好的例子就是 Philadelphia 染色体，它存在于很多慢性粒细胞白血病（chronic myelogenous leukemia，CML）的患者体内。而 Philadelphia 染色体是由于 9 号染色体与 22 号染色体之间发生

相互易位产生的。这个易位会使 *Bcr* 基因和 *Abl* 基因相互融合，并形成与此相关的杂合可读框（hybrid reading frame）。由此而产生的杂合蛋白包含了 Bcr 蛋白的 N 端以及 Abl 蛋白靠 C 端的大部分区域。这个杂合蛋白通过某种机制变得具有致癌性还不清楚；但人们已知，Abl 蛋白编码一种信号分子，这种信号分子发挥的作用与 Rous 肉瘤病毒所编码的 Src 蛋白很相似。图 13.12 显示的是原癌基因发生功能获得性突变的不同途径。

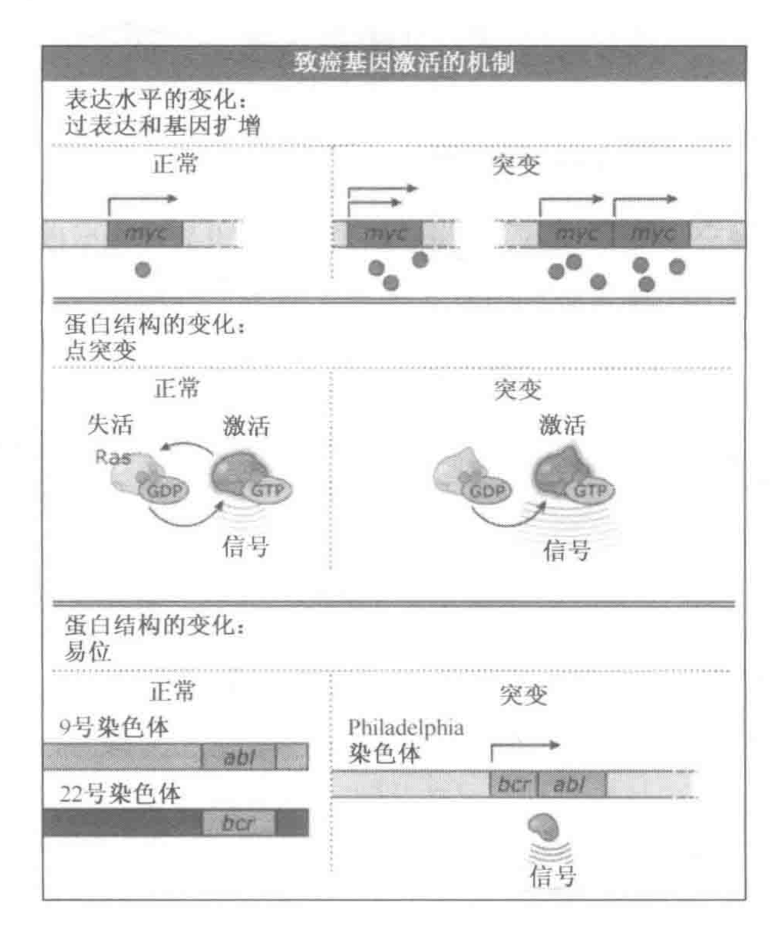


图 13.12　癌基因可以通过数量上的变化和性质上的变化而被激活。

正如我们所看到的，基因在性质上发生的变化（如 *ras* 和 *Bcr-Abl* 的例子）和在数量上发生的变化（如 *myc* 的例子）都可以导致细胞发生转化。

13.6　消除肿瘤抑制因子的活性需要两个突变

关键概念

- 通常，抑癌基因的两个等位基因都失活才能引起表型的变化。
- 导致杂合性缺失（loss-of-heterozygosity）的机制通常可以导致抑癌基因剩下的那个正常的等位基因也发生缺失。
- 遗传了具有杂合突变的抑癌基因可以导致癌症易感性的产生。

活化突变可以使原癌基因转化为癌基因，而其他类型的突变可以导致抑癌基因（tumor suppressors gene，TSG）的失活。但是，这两个过程并不是对称的，因为癌基因的活化通常只需要单一的遗传学变化（genetic change），而消除抑癌基因则需要两个

突变。

上述情况可以用孟德尔遗传学法则进行说明。能使原癌基因转化为癌基因的活化突变总是能够产生一个显性等位基因（dominant allele)，即使在它的同源染色体（homologous chromosome）上与之共存的另一个等位基因是野生型的，这个显性等位基因也能影响细胞表型。但能使抑癌基因中的一个拷贝失去功能的失活突变总是产生一个隐性无效等位基因（recessive null allele)，而它却不会影响细胞的表型，因为在它的同源染色体上还存在一个野生型的等位基因。只有当这两个等位基因都失活或都缺失的时候，这个抑癌基因才会失活，细胞才会摆脱这个抑癌基因的抑制作用。

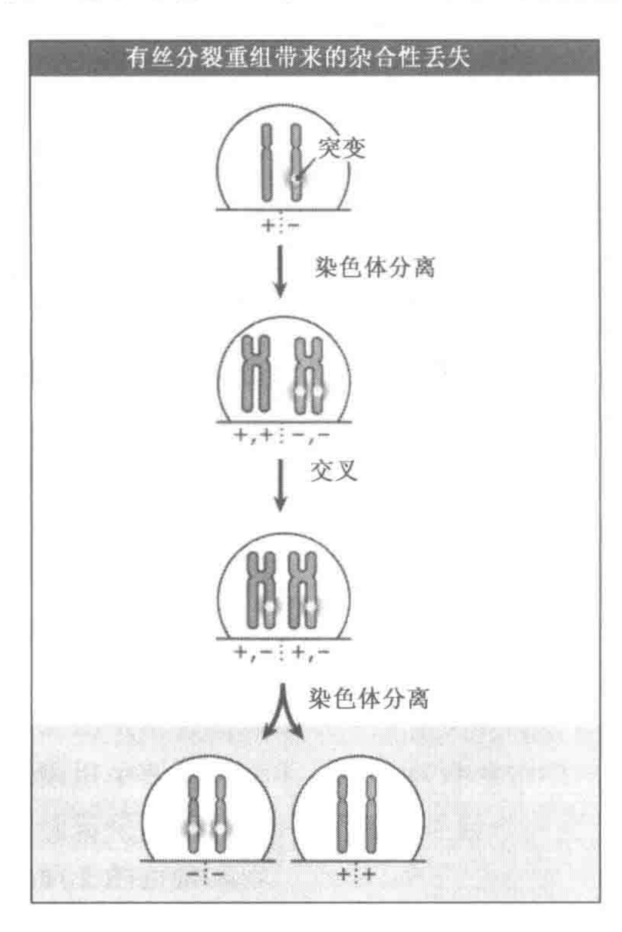


图 13.13 如果体细胞分裂过程中发生染色体同源重组和两个突变染色体的分离，一个杂合性突变会变为纯合性突变。

所有类型的突变，包括使抑癌基因中的一个拷贝失活的突变在每一代细胞中发生的可能性都相当低（发生概率通常只有 10^{-6}）。这就使得抑癌基因中的两个等位基因都失活成为了一种很罕见的事件，这是一个数学问题：两个这样的突变都发生的概率是每一个突变发生概率的乘积，即 $10^{-6}\times10^{-6}$。这个结果就说明了这是一个不大可能发生的事件（每 10^{12} 个细胞中才可能有一个细胞发生两个等位基因都失活的事件）。

然而，正在恶性转化的细胞确实成功地使关键的抑癌基因失活，否则，这些抑癌基因将会抑制它们的增殖。这些细胞并不是通过上面所述的那个不大可能发生的机制来去除第二个等位基因，从而使抑癌基因失活的，相反，第二个依然是野生型的等位基因是在一个被称为**杂合性缺失（loss-of-heterozygosity，LOH）**的过程中丢失的。一个染色体臂会被丢弃并由与其同源的一个复制本代替，这个复制本来自其同源染色体，这个机制涉及了体细胞中发生的重组，如图 13.13 所示。这个过程，在每个细胞世代中发生的概率至少有 10^{-3}，可以导致原本以杂合态形式存在的基因转化为纯合状态。以一个带有抑癌基因的染色体臂为例，这个过程会使野生型等位基因丢失，并由已发生突变的那个等位基因的复制本所代替。其结果就是产生了一个失去这个抑癌基因所有有功能的、野生型拷贝的细胞。

在很多癌症中，重要抑癌基因功能的丧失是通过基因表达沉默实现的，通过位于相关抑癌基因启动子周围的 CpG 序列中胞嘧啶的甲基化来完成的。许多研究得比较清楚的抑癌基因的失活都与启动子的甲基化有关，而且它在消除抑癌基因功能方面与抑癌基因编码序列突变一样有效。例如，在一些肿瘤中，视网膜母细胞瘤基因（retinoblastoma，*Rb*）的启动子区域发生了甲基化，而其 DNA 编码序列没有发生变化。*Rb* 基因启

动子的甲基化使该基因的转录被关闭。有时，*Rb* 基因的一个拷贝由于启动子甲基化而失活，而剩下的那个野生型拷贝也被甲基化拷贝的复制本所代替（*Rb* 的细节见 13.10 抑癌因子会阻止细胞不恰当地进入细胞周期）。

体细胞还可以通过其他机制使关键的抑癌基因失活。这些机制与遗传性肿瘤综合征（hereditary cancer syndrome）相关，在遗传性肿瘤综合征中，急剧增强的肿瘤易感性以可遗传的方式从亲代传给子代。很多类型的家族性肿瘤综合征都是由于某个抑癌基因中的有缺陷的拷贝通过生殖细胞向后代传递所造成的。以广泛研究的家族性视网膜母细胞瘤为例，*Rb* 基因的一个有缺陷的等位基因可以从父母一方获得，也可以在精子或卵子形成过程中产生。无论通过哪一种机制，其结果都是产生这样一个受精卵，它带有一个 *Rb* 抑癌基因的突变拷贝和一个野生型拷贝。子代的所有体细胞都会呈现这种杂合状态。

Rb 基因位点的杂合性，使个体在幼儿期对视网膜母细胞瘤产生易感性，在成人期对骨肉瘤具有易感性，其原因还不清楚。在每一种情况下，靶组织中的某个细胞都有可能丢失 *Rb* 基因的那个野生型拷贝，从而导致细胞完全丧失 *Rb* 基因的活性，这通常是通过杂合性缺失实现的。这个双突变的细胞已经满足了肿瘤形成所必需的第一个条件。在这里，某个特异靶组织中肿瘤形成的概率之所以显著增加，是因为这个组织在胚胎发育形成过程中，两个必需突变中的一个已经存在于该组织的所有细胞中了。

其他类型的家族性癌症也是由于遗传了有缺陷的抑癌基因所造成的。很多患有 Li-Fraumeni 综合征的病人都是从亲代那里遗传了 *p53* 抑癌基因中的一个有缺陷的等位基因，从而使很多上皮组织和间充质组织的癌症易感性增强（*p53* 的细节见 13.11 具有 DNA 修复和维护作用的基因的突变会增加总突变率）。有两种类型的神经纤维瘤的发生也是由于 *NF*-1 或 *NF*-2 基因中有突变的等位基因从亲代传给了子代。家族性腺瘤性息肉（familial adenomatous polyposis）患者在结肠中长有几十到上百个息肉，其中的一些息肉可能会发展为癌症，这种疾病也是由于遗传了有缺陷的 *APC* 基因所造成的。一旦结肠上皮细胞又失去了 *APC* 基因中那个正常的拷贝，那么所产生的 $APC^{-/-}$ 细胞的后代就会发生与非家族性（偶发的）结肠肿瘤（nonfamilial colon carcinomas）发展过程相同的的遗传学改变。

13.7 肿瘤的发生是一个复杂的过程

关键概念

- 癌症的发生是一个多步骤的过程，一般需要 4～6 个不同的突变才能形成肿瘤。
- 肿瘤的发展是通过克隆扩张（clonal expansion）进行的，异常不断增加的细胞克隆的生长速度会逐渐超过周围突变较少的细胞。

癌症的形成是一个复杂的、多步骤的过程，通常需要几十年的时间。在一些癌变组织中，同时存在着完全正常的细胞、完全恶变的细胞以及处于这个范围中间状态的细胞。例如在结肠中，这个范围开始于分布在结肠中的正常的结肠上皮；接着有**轻微的增生（hyperplasia）**（过量的细胞）；接着是**异常性增生（dysplasia）**（上皮已濒临异常，包括相对未充分发育的**息肉**）；然后再进一步发展为成熟的、体积大的息肉（位置固定、

不具侵润性生长、常突出到肠腔中)。最后是真正的恶性肿瘤，它们可以侵润上皮下面的肌肉层，也可以穿越包裹它们的膜层，还可以在远处部位，如肝脏进行附着生长（转移)。

当我们对结肠上皮细胞在各个不同阶段所发生的基因突变进行分类研究时发现，在四个不同基因位点发生的突变促使了肿瘤的形成。细胞生长越接近于完全癌变，基因组中这四个基因的突变“版本”的数量就越多。图 13.14 显示的是肿瘤的发展进程与突变间的相关性。尽管只是相关性，但这个证据还是表明，每一个持续的突变都会促使细胞更接近于完全恶性生长的状态。

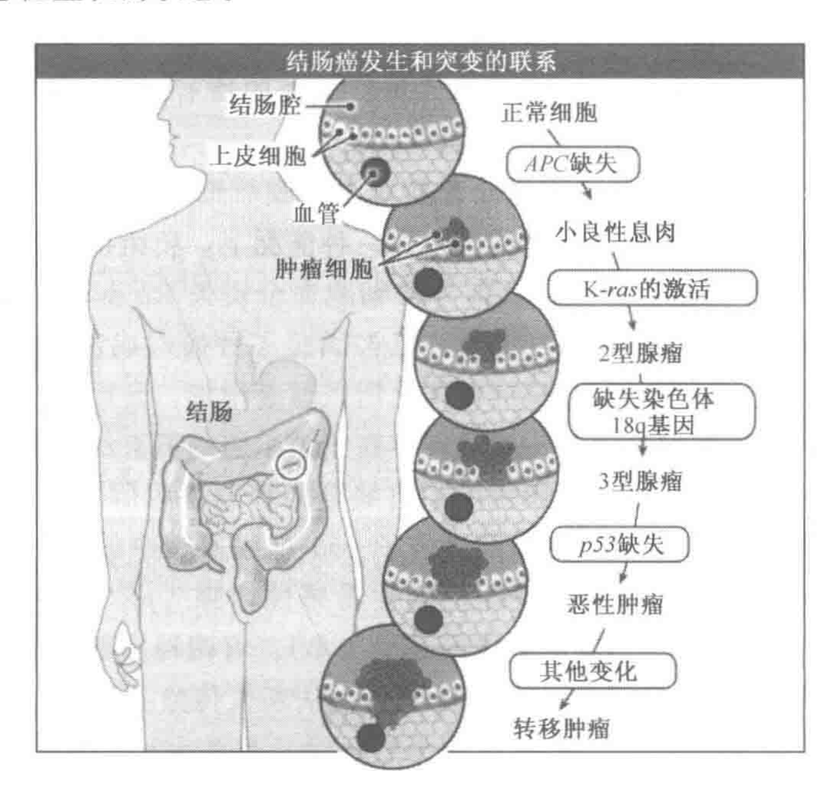


图 13.14　在结、直肠癌中，*APC* 基因的突变启动了肿瘤的发生过程，而其他突变也与肿瘤发生过程的各个阶段相关。

还有其他一些证据也表明癌症的发生过程需要多个步骤。首先，人群中成年人肿瘤的发病率大多数可以用数学函数预测，这与他们年龄的 4～6 次方有关。这一相关性表明，在肿瘤发生过程中存在一定数量的限速步骤，在单位时间内每一步发生的可能性较低，所有这些步骤都发生，才会出现明显的临床症状。具体来说，癌症可能是连续发生的 4～6 个突变的最终结果，而每一个突变在细胞的一代中发生的概率都相当低，而且必须所有的突变都发生了以后，细胞才会进入完全的恶性生长。图 13.15 显示的是在不同的年龄段癌症的发生率。

其次，正常细胞与我们以前所讨论的永生化的培养细胞不同，正常细胞不会因为一个癌基因的引入就转化为肿瘤细胞。例如，完全正常的啮齿类动物细胞转化为致癌状态至少需要两个不同的癌基因。这两个同时引入的癌基因，如 *ras* 和 *myc* 或 *ras* 和 E1A，可以相互协同作用使细胞发生转化，但任何一个癌基因都不能单独使细胞发生转化。因此，如果要使一个完全正常的细胞转化为一个癌细胞，则至少必需两个甚至更多的基因突变。图 13.16 描述了癌基因之间这样的协作。人类细胞甚至需要更多的突变基因才能

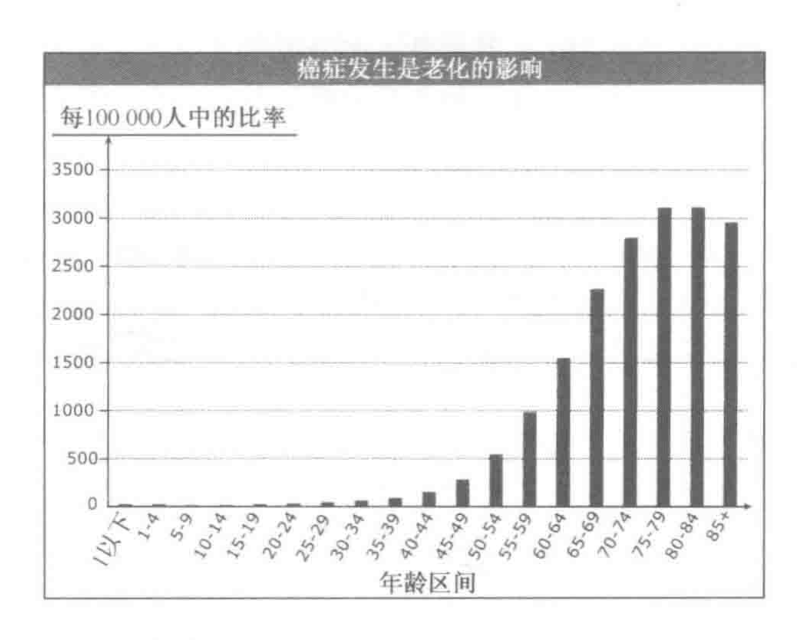


图 13.15　有一点能够表明癌症的发生是多步骤过程，那就是癌症发展过程所需要的时间。图中数据来自于美国国家癌症研究所。

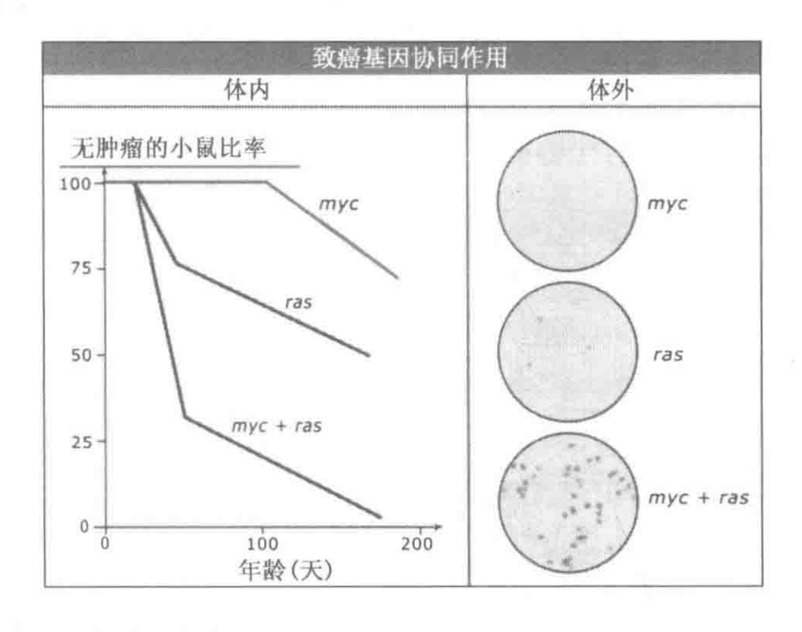


图 13.16　左图显示的是，表达 *ras* 或过度活跃的 *myc* 的转基因小鼠在一段时间内产生的肿瘤数要少于同时表达这两个基因的小鼠。右图显示的是，共转染 *ras* 和 *myc* 可以导致小鼠胚胎成纤维细胞发生转化；而单独转染 *ras* 或 *myc* 却不能导致细胞发生转化。左图修改自 *Cell*，vol. 49，Sinn，E.，et al.，*Coexpression of MMTV/v-Ha-ras*…，pp. 465-475。原图由 Harvard 医学院遗传学系和 Howard Hughes 医学研究所的 Eric Sinn 惠赠。右图修改自 Land，H.，Parada，L. F.，and Weinberg. R. A. *Nature*. 1983. 304：596-602。

转化为癌细胞，有时需多达 5 个突变。

第三个证据来自于对转基因小鼠的研究。这些转基因小鼠利用生殖细胞来传递可以表达的 *ras* 或 *myc* 癌基因。这些基因的表达受到了一种转录启动子的调控，这种转录启动子在乳腺上皮细胞中是活化的。如人们所料，转基因导致这些小鼠有较高的乳腺癌发病率。然而，尽管在这些小鼠的生命早期，*myc* 或 *ras* 基因就在所有乳腺上皮细胞中具有很高的表达，但这些小鼠只有在出生 3～4 个月以后才会出现乳腺癌。显然，除了在

这些乳腺上皮细胞中活化 *myc* 或 *ras* 基因外，至少还需要 1～2 个体细胞突变，才能诱导这些细胞发生癌变。人们推断，体细胞突变会影响这些细胞中特异的原癌基因或抑癌基因。很明显，当这些小鼠的乳腺上皮细胞同时表达 *myc* 和 *ras* 基因时，肿瘤形成的进度会大大加快，肿瘤形成前的迟滞时间（lag time）也会相应地缩短，见图 13.16。但是，即使细胞中同时表达 *myc* 和 *ras* 基因，肿瘤的形成依然有迟滞，这说明肿瘤的形成还需要其他事件，而这个事件可能就是偶然的体细胞突变。

各种各样的证据可以组合在一起形成一个简单而合乎逻辑的观点，即肿瘤发展过程（通常称为进程）在形式上类似于达尔文的进化论。一个细胞在其一个生长调控基因上保持突变状态，而这个突变可以使这个细胞及其后代的增殖速率高于周围正常细胞。随着时间的推移，这些细胞就形成了一个细胞克隆，其中可能包含了几百万个细胞，这个细胞克隆会在组织中的一小块区域内占据优势地位。接着，这个克隆内的一个细胞会发生另一个体细胞突变，使得这个特殊的细胞生长速率进一步加快并更有效地生存。不久以后，这些双突变细胞的生长速率就会超过周围所有的细胞，一段时间后，就会完全控制组织中更大的一块区域，见图 13.17。每一轮突变都会导致**克隆扩张**，有时也被称为**克隆演替（clonal succession）**，这就会产生出更异常、更适于增殖的细胞群。这些细胞逐渐增加的异常性表现在它们产生出越来越畸形的组织结构。就像达尔文进化论所说的那样，偶然发生的突变产生了在遗传上具有杂合性的群体，而碰巧获得了有利于生长的突变的那个细胞就成为了占有优势的后代群体的祖先。

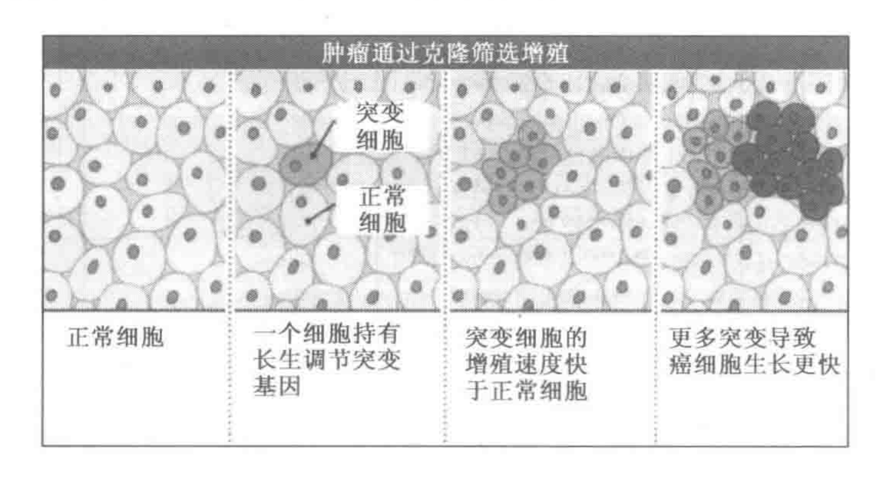


图 13.17　当带有促进生长失控突变的细胞比不带有这些突变的细胞更频繁地分裂时，克隆选择就开始了。任何细胞如果又获得了其他可促进生长的突变，那么它将产生出一个新的，生长速率超过周围细胞的细胞群。

我们已知，肿瘤病毒用单一的癌基因就可以使细胞发生转化，而我们对于肿瘤发生需要多步骤的观察结果似乎与此相冲突。事实上，这两组观察结果很难相互协调。在多步骤的肿瘤发生过程中，发生改变的细胞表型数目远远超过产生一个癌细胞所必须突变的基因数目，在人类中需要突变的基因数目可能是 6 个。因此，每一个这样的突变基因都要发挥多效作用以诱导多种细胞表型发生变化。但还没有任何一个这样的基因能够独自诱导细胞发生完全地转化。尽管 RSV 对鸡成纤维细胞的转化作用使我们获得了重要的观察结果，即细胞中存在原癌基因，但从另一个方面来说，RSV 又误导了研究人员，使他们认为单一的基因突变就可以导致细胞发生转化。这些争论对一个简单的模式提出

了挑战，这个模式认为易感的靶细胞的基因组中一个简单的突变就可以诱发癌症。

13.8 生长因子激活细胞的生长和增殖

关键概念

- **细胞信号转导需要细胞外因子、受体以及其他能将信号传到细胞核的蛋白质的参与。**
- **细胞外信号可以促进生长也可以抑制生长。**
- **很多编码细胞信号分子的基因是原癌基因和抑癌基因。**

若要理解癌基因和抑癌基因上的突变是如何影响细胞生长和增殖的，我们就要首先讨论一下细胞在正常情况下，这些过程是如何被调控的。细胞会对一系列细胞外信号产生反应，尤其是那些由生长因子传递的信号。这些生长因子通常是由细胞释放的，会穿越细胞间的空间对其他细胞产生影响，而靶细胞则通过上调或下调其增殖速率来对这些生长因子做出反应。靶细胞所具有的这种正负调节能力表明细胞中存在着复杂的“机器”，用来接受、加工细胞外信号，并改变细胞生长速率。我们将以 Ras 和 TGF-β 信号通路为例来说明信号通路是如何运转的，又是如何出错的。

细胞在其表面会表达一系列用于感知并结合生长因子的受体，每一个受体都特异性地结合其自身的**配体**。例如，PDGF 只特异性地与细胞表面的 PDGF 受体结合，而 EGF 也只与 EGF 受体结合。受体与其配体结合后，就会将信号从细胞膜**转导（transduce）**到细胞内。随后，这个信号会沿着一个复杂的信号转导蛋白级联反应（cascade）向下传递，在这个级联传递过程中，每一个分子都从其上游分子那里获得信号，然后将信号加工并放大，再传递给其下游的一个或多个分子，如图 13.18 所示。原癌基因编码的蛋白质会出现在信号级联的很多步骤中。

有一类原癌基因编码生长因子蛋白。如果这样的一个基因在细胞中不恰当地表达生长因子，而同时这个细胞又具有其特异性的受体，那么就会形成一个正反馈环（positive feedback loop）。因此，当这样的一个细胞释放大量的由原癌基因编码的促有丝分裂生长因子到细胞周围的环境中，这些生长因子就会结合并活化自身的表面受体，从而刺激细胞持续生长，如图 13.19 所示。这时，这个细胞就可以不依赖于外源性生长因子，因为它可以自己产生促有丝分裂信号。这种自我刺激的生长被称为**自分泌**信号转导（autocrine signaling）。它与**旁分泌**信号转导（paracrine signaling）以及**内分泌**信号转导（endocrine signaling）不同，旁分泌信号转导是指相邻近的细胞之间的信号传递，而内分泌信号转导是指机体中的内分泌细胞分泌出信号分子（激素），经血液循环到达身体各个部位的靶细胞，引起靶细胞的反应。

第二类的原癌基因则编码生长因子受体。当其功能异常时，它们就能够在没有结合配体的情况下，向细胞内发出生长刺激信号。这些细胞也具有了生长因子非依赖性，在诱导增殖所必需的促有丝分裂生长因子不存在的情况下，这些细胞依然会增殖。事实上，编码生长因子受体的原癌基因会以两种完全不同的方式发生改变。图 13.20 显示，一些癌基因编码的蛋白质是截取顶部的生长因子受体。例如，在很多人类肿瘤中，截取顶部的 EGF 受体失去了胞外的 EGF 结合区，但依然能够在无外源性生长因子的情况下不断提供增殖信号。在一些其他种类的肿瘤中，如乳腺癌、脑癌和胃癌中，EGF 受体

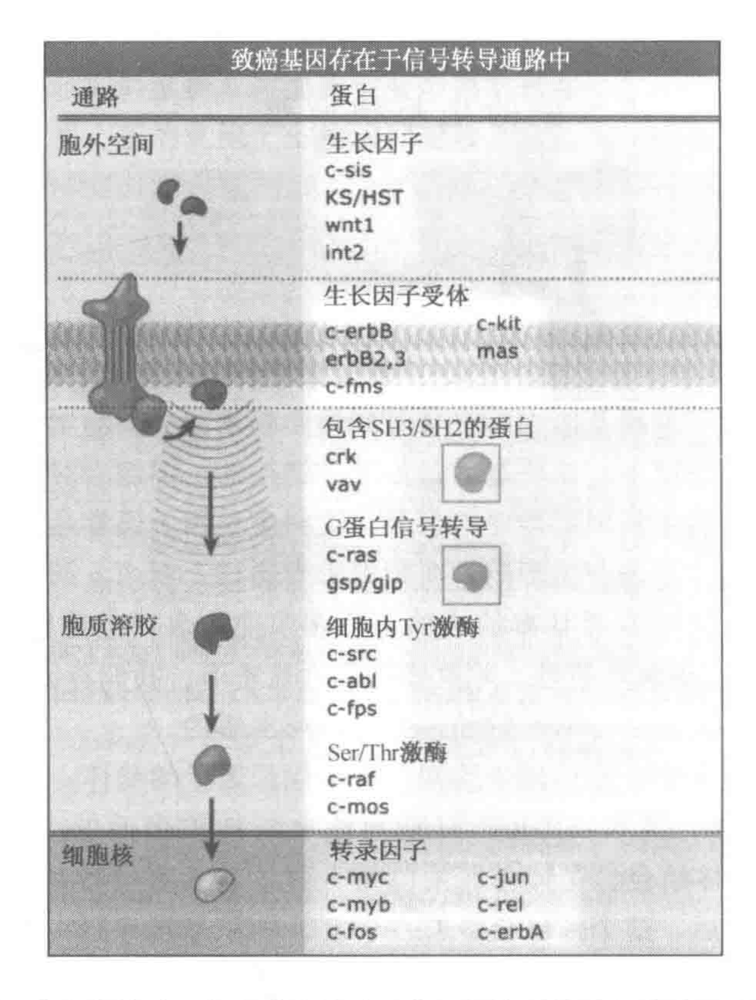


图 13.18　许多在转导生长促进信号过程中发挥作用的蛋白质可以成为癌蛋白。

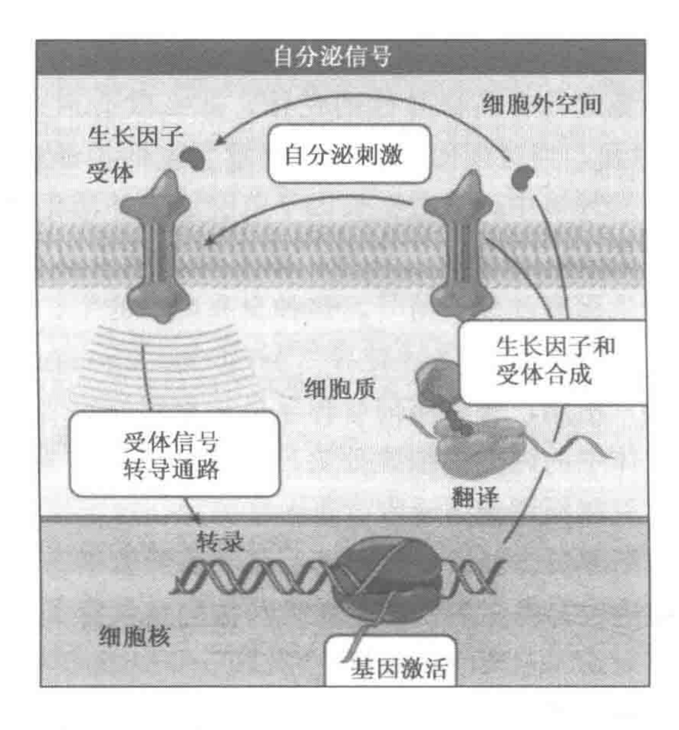


图 13.19　当一个细胞产生了促进自身生长的生长因子时，就建立了自我维持的自分泌环路。

会过度表达，其表达水平远远高于正常细胞中的表达水平。这样，EGF 受体也可以在不依赖于配体的情况下不断提供增殖信号。

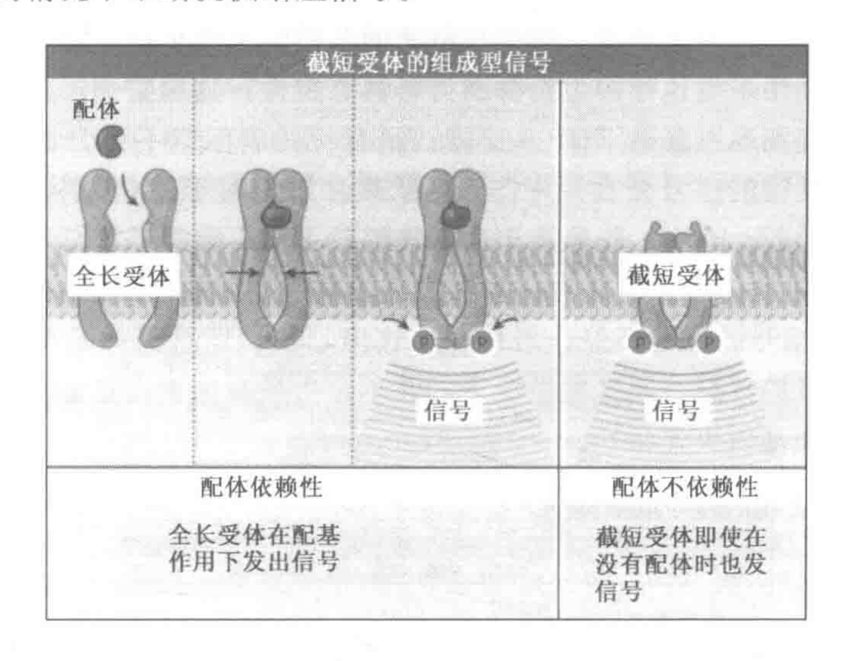


图 13.20　在一些情况下，去除受体的配体结合区会导致受体不断地发出信号，因为受体二聚化不再需要配体的结合。

位于生长因子受体下游的胞内蛋白起到了对受体发出的信号进行加工的作用，这些蛋白也是癌基因活化的目标。*ras* 原癌基因编码的蛋白就是一个很好的例子。正常的 Ras 蛋白以钝化状态存在于细胞质中，接受由细胞表面受体传来的信号。当细胞表面受体被配体活化后就会发出信号，信号通过一系列中介蛋白传递到 Ras 蛋白，Ras 蛋白接受信号后会转变成活化的并且可以发出信号的构象。Ras 蛋白的这种活化状态持续时间相当短，随后就又恢复到钝化状态，停止向下游传递信号。

如果细胞中的 *ras* 癌基因发生突变，就会编码结构异常的 Ras 癌蛋白，这种 Ras 癌蛋白可以变为活化状态，但却不能恢复到钝化状态。因此，它就可以始终保持活化状态，从而连续几分钟甚至几小时不断地向细胞发出生长刺激信号。这不同于正常 Ras 蛋白传递信号的脉冲方式。图 13.21 显示的就是活化的 Ras 蛋白与正常的 Ras 蛋白之间的不同之处。这种功能异常的 Ras 蛋白存在于大约 1/4 的人类肿瘤中。

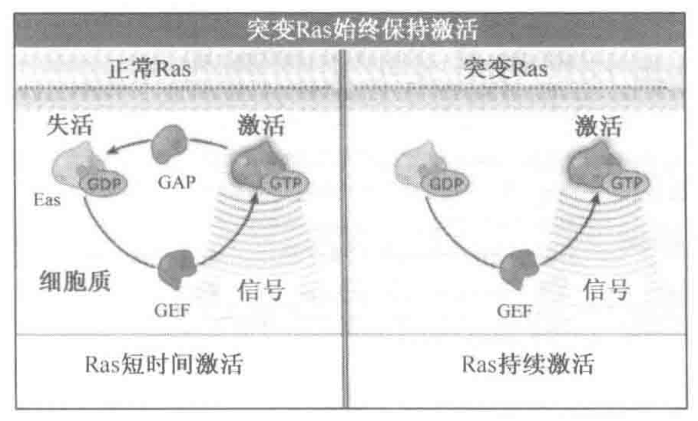


图 13.21　一些发生突变的 Ras 蛋白始终保持与 GTP 相结合的构象，从而可以不断活化下游的信号转导通路。

细胞对外部信号所做出的反应也可以抑制自身的生长和增殖。如前所述，TGF-β是一种对生长起负调作用的信号分子，如图13.22所示。由于TGF-β的作用，细胞会暂时进入一种无活力的静息状态。细胞在将来的某些时刻也可以从这种状态退出，重新恢复增殖活力。癌细胞对这样的生长抑制信号具有抗性，这与它们不再需要生长因子的刺激一样。一些癌细胞不表达TGF-β受体；还有一些癌细胞不再合成一种关键的下游信号蛋白，这种关键的信号蛋白属于Smad家族，它们对于将信号从TGF-β受体传到细胞核是至关重要的。有时，细胞会产生有缺陷的Smad蛋白，它们已经不能恰当地传递TGF-β受体发出的信号了。还有一些细胞缺乏某些细胞核内的“装置”，从而使细胞无法因为TGF-β信号的作用而停止增殖。在这里，我们所看到的是那些涉及接受并加工促有丝分裂信号的情况。在这些情况下，并不是生长刺激蛋白过度活跃，而是负责抑制细胞增殖的抑癌基因失去活性。

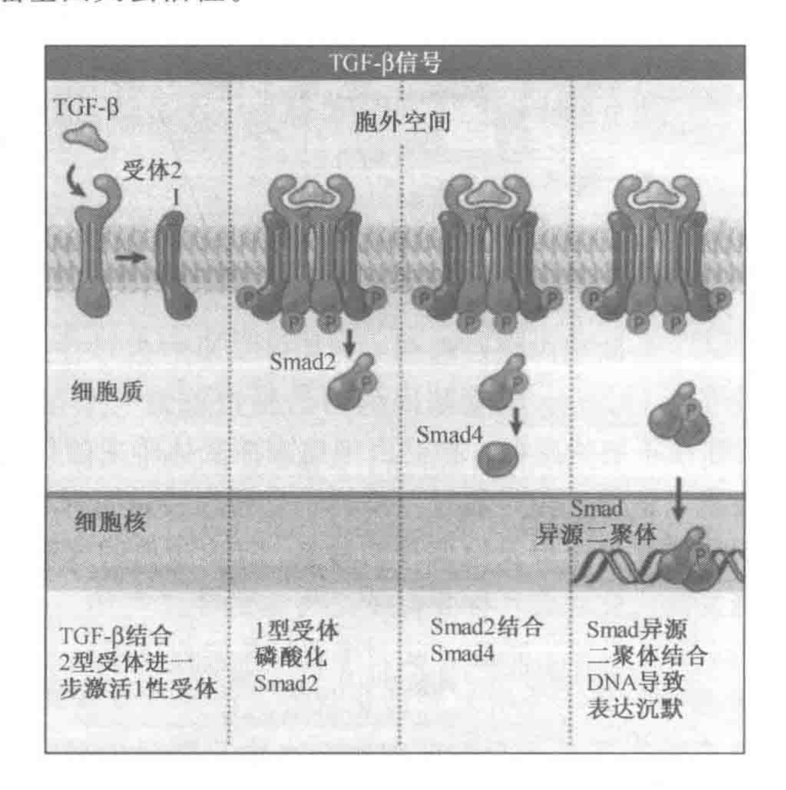


图13.22　TGF-β是一种生长抑制信号。当细胞受到TGF-β作用后，就会经过信号级联通路活化Smad蛋白，而Smad蛋白会诱导抑制生长的蛋白质的转录。

13.9　细胞受到生长抑制后可退出细胞周期

关键概念

- 分化的细胞实现了它们最终的特化形式。
- 分化细胞通常是不再进行有丝分裂的（postmitotic）；因此，分化使分裂的细胞库（pool）减小。
- 细胞可以通过凋亡的方式自杀。
- 机体以细胞凋亡的方式在其发育过程中以及生命的其他阶段清除健康的细胞。
- 机体以细胞凋亡的方式清除会对自身产生伤害的受损细胞。
- 使细胞丧失凋亡能力的突变可以导致细胞癌变。

在上一节中，我们了解了 TGF-β 信号通路是如何使细胞进入静息状态的。限制细胞增殖的另一条途径与**分化**（**differentiation**）过程相关，在分化过程中，机体内被称为**干细胞**（**stem cell**）的胚胎细胞会呈现出其所在组织中的细胞所具有的典型特征。事实上，细胞分化使这些细胞具有了组织特异性的功能。大多数类型的分化细胞不再进行有丝分裂；也就是说，它们丧失了继续分裂的能力。而干细胞则具有在生长和分裂过程中不断更新自己的能力。因此，一个组织通过诱导其中的干细胞进入有丝分裂后的分化程序，就可以减少该组织中能进行复制的细胞的数量。图 13.23 显示，与干细胞不同，大多数类型的分化细胞不再进行分裂。

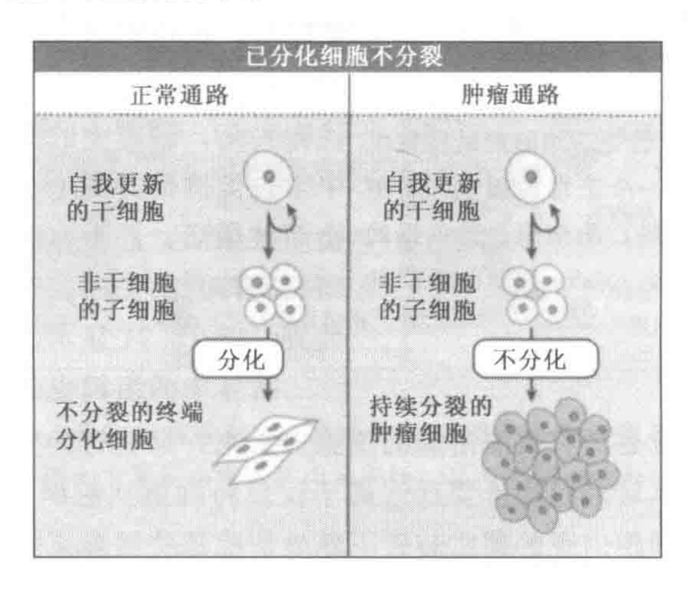


图 13.23　分化是限制分裂细胞数量的一种途径。如果细胞不能进行分化，就有可能导致肿瘤的发生。

很多类型的癌细胞的行为方式与干细胞相似，它们不能进入有丝分裂后的分化状态。因此，负责诱导细胞进入有丝分裂后分化的基因和蛋白质就起到了抑癌因子的作用，它们和 TGF-β 信号通路中的各个组分一样具有生长抑制效应。在上述两种情况下，组织所具有的复制潜能都受到了抑制；而且，在上述两种情况下，相关基因和蛋白质的缺失或失活增强了早期癌细胞增殖的能力，从而产生出大量的异常子代细胞。最近的研究进一步修正并更详尽地阐述了这个问题。更特别的是，正常组织的“机构组成方式”，包括能自我更新的、未分化的干细胞和已分化的有丝分裂后细胞，也被肿瘤细胞所采用。例如，乳腺肿瘤中的大多数癌细胞如果被移植到正常的小鼠体内，它们就无法产生出新的肿瘤；在这种情况下，这些细胞并不具有致癌性并丧失了自我更新的能力。相反，肿瘤中一个小的癌细胞亚群却具有致癌性（也就是说，它们可以产生出新的肿瘤），并且具有无限的自我更新能力。这就解释了为什么大多数肿瘤显示出的组织学（histological）特征与它们所起源的正常组织非常相似。这种特征是由肿瘤中大多数细胞所产生的，这些细胞已经变为有丝分裂后细胞，并且经历了部分的分化。

至此，我们已经讨论了细胞用来抑制其增殖的两条途径：① 细胞可以进入一种静息状态，细胞在将来的某一时刻也可以从这种状态退出，重新恢复增殖活力。② 细胞也可以进入有丝分裂后的分化状态。事实上，还有第三种机制也可以抑制细胞增殖，这种机制依赖于**细胞凋亡**。可以激活细胞凋亡的“装置”实际上存在于机体所有类型的细

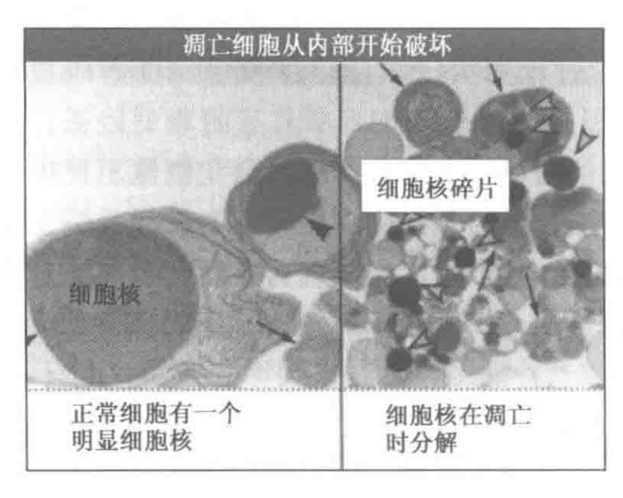


图 13.24 在细胞凋亡过程中，细胞的结构发生了变化。左图显示的是一个正常的细胞。右图显示的是一个正在发生凋亡的细胞；箭头指的是凝集的核碎片。照片由 Osaka 大学医学院的 Shigekazu Nagata 惠赠。

胞中，其目的就是迅速而有效地辅助清除组织中的细胞。在正常的发育过程中以及在成熟个体的生命过程中，细胞凋亡可以起到多种作用。这种细胞自杀程序在发育过程中可以清除不需要的健康细胞，如在肢体发育过程中，细胞凋亡可以清除最初位于指（趾）间的蹼状结构。除此之外，细胞中的凋亡装置还会因细胞基因组出现不可修复的损伤而被激活，而这种不可修复的损伤是由新陈代谢失衡引起的，如由**缺氧（anoxia）**引起的代谢失衡；细胞中的凋亡装置还会因为细胞中生长促进信号和生长抑制信号流量上的失衡而被激活；甚至在细胞无法恰当地附着在固相支持介质上时，也会激活细胞中的凋亡装置。图 13.24 显示的是一个凋亡细胞。

机体中的组织也会利用细胞凋亡来清除那些表现异常的，也就是具有致瘤潜能的细胞。否则，那些行为异常的细胞（如早期的癌细胞）给组织和机体带来的代价要远远高于仅仅将细胞从组织中清除所付出的代价。所以，组织就会利用细胞内置的凋亡装置不断地清除那些偏离正常行为的细胞，哪怕只是很小的偏离。

凋亡装置也会与信号传递的失衡相协调，如当细胞中的一个癌基因活化时，就会发生信号传递的失衡。由于细胞中始终保持警惕的凋亡装置的作用，所以大多数情况下，偶然获得一个癌基因突变的细胞都不可能成功地产生出大量的子代细胞群体，因为凋亡装置会在这些突变细胞有机会增殖前就将它们清除。这表明，有一组重要的抑癌蛋白起到了激活并执行细胞凋亡的作用；在很多类型的细胞中，只有在这些抑癌蛋白失活或缺失以后，细胞才能产生出大量的恶性子代细胞。我们得出结论：另一组重要的抑癌基因起到了促进细胞凋亡的作用，只有当这些抑癌基因失活的时候，才会产生某些类型的肿瘤。人们认为，在所有种类的人类癌细胞中，凋亡装置的一些成分失去了活性，从而使癌细胞可以生存并增殖，这个观点确实是有道理的。

13.10 抑癌因子会阻止细胞不恰当地进入细胞周期

关键概念

- 在限制点，细胞会决定是否发生分裂。
- pRb 是一种抑癌因子，它可以阻止细胞通过限制点。
- pRb 可能由于突变而失活，也可能被原癌蛋白“扣押”（sequestration）而失活，或是由于 Ras 通路的过度活化而失活。

作用于细胞的各种信号，不管是正调控的还是负调控的，都必须经过整合和加工后，才能最终决定细胞的生长、静息和分化。如前所述，分裂细胞能够可逆地脱离细胞

周期进入一种不生长的静息状态，也能够不可逆地脱离细胞周期进入一种有丝分裂后的分化状态。细胞所做出的是生长还是静息的决定发生在细胞周期的 G_1 期。在向 G_1 期末期过渡的某个点，也就是在 G_1 期向 S 期转化前的某个特定点时，细胞会决定是分裂还是进入到不生长的 G_0 期。这个特定点被称为**限制点（restriction point）**（见图 13.25）。一旦细胞通过限制点，就会以一种完全自动的方式自主完成细胞周期剩下的部分（如 G_1 期的最后部分、S 期、G_2 期和 M 期），除非细胞遭受基因损伤或是新陈代谢方面的损伤。图 11.13 显示了细胞周期和限制点。

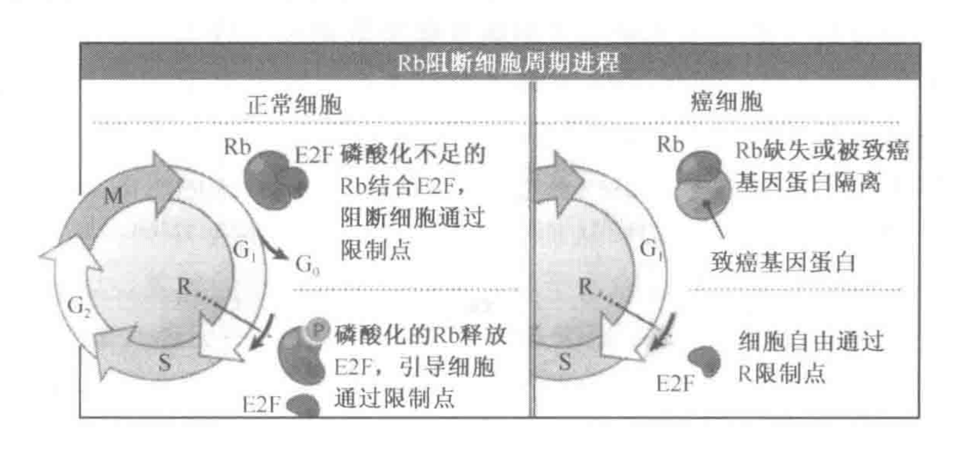


图 13.25 *Rb* 基因是一个主要的抑癌基因，它编码的 pRb 蛋白可以结合 E2F 转录因子，从而阻止 E2F 转录因子去激活细胞进入 S 期所必需的基因的表达，从而阻断细胞周期的运转。

促有丝分裂信号对细胞是否能通过限制点具有正向调节作用，细胞在 G_1 期一开始就接受到这些促有丝分裂信号。相反，抗有丝分裂信号，如 TGF-β 传递的信号，则对这一过程具有负调控作用。所有类型的人类癌细胞以一种不完善的方式做出了让细胞通过限制点的决定。

在限制点发挥重要作用的一种蛋白质就是视网膜母细胞瘤基因所编码的 pRb 蛋白。pRb 以两种状态存在：去磷酸化（hypophosphorylation）状态和超磷酸化（hyperphosphorylation）状态。处于去磷酸化状态的 pRb 会阻止细胞通过限制点；而处于超磷酸化状态的 pRb 则会引导细胞通过限制点，如图 13.25 所示。在一系列人类肿瘤中，包括以前提及的视网膜母细胞瘤和骨肉瘤中，由于 *Rb* 基因的两个等位基因都发生失活突变，所以细胞中就缺失了 pRb。在宫颈癌中，pRb 出现功能失活，被人乳头瘤病毒所产生的一种原癌蛋白所“扣押”，人乳头瘤病毒是大多数这类肿瘤的诱导物。

pRb 除了可以通过调节 G_1 期的运转来调控细胞分裂外，还可以和许多转录因子协同作用来表达组织特异性的分化程序。例如，在肌肉分化中，pRb 可能与负责诱导肌肉特异性基因的转录因子相关联。所以，pRb 可能将细胞增殖停滞与分化联系起来。

13.11 具有 DNA 修复和维护作用的基因的突变会增加总突变率

关键概念

- DNA 修复蛋白使自发突变的发生率保持在很低的水平。
- 若 DNA 修复基因有缺陷，就会增加突变的基础发生率。
- 检验点蛋白的突变会影响染色体的完整性。

根据已知的突变率和估计的突变基因数来计算癌症发生的可能性是一个有挑战性的难题，因为在高度发展的癌细胞基因组中，突变和突变基因数是不断积累的。癌症发生所需要的步骤是如此之多，而正常的自发突变率又是如此之低，以至于很难，甚至无法理解在一个人 70～80 年的一生中，癌症会如何产生。

对于这个悖论的解释来自于一个关键的参数，这个参数包含在以上这些计算结果中，即自发突变的正常发生率。也许癌细胞在每一代中积累突变的速率要远远高于正常细胞。像这样不断增加的突变数使得癌症的出现在数学原理上似乎是可能的。

一方面，自发突变的发生率受到了物理及化学致癌物损伤 DNA 的概率的影响，也受到 DNA 聚合酶在 DNA 复制过程中错误复制 DNA 链的概率的影响。而另一方面，很明显，大多数由于错误复制或 DNA 损伤而造成的错误序列会被迅速地消除并恢复为野生型序列构象。细胞所具有的监控系统可以不断地监视着基因组的完整性，清除错误的碱基并用正确的碱基取代它们，从而引导重建原初的 DNA 序列。而且，这个 DNA 修复系统也可以高效地检测并清除由于氧化过程而造成损伤的碱基，以及由于其他能影响 DNA 和其碱基的化学反应而造成损伤的碱基。所以，这个 DNA 修复装置可以成功地将每个基因在细胞的每代中的突变率控制在 10^{-6} 以下。

此外，一些“检验点控制”机制可以确保细胞只有在成功完成了周期运转中的关键步骤后才能够进入下一阶段。所以，如果 DNA 受到损伤，DNA 的合成就会被终止；如果 DNA 的合成没有完成，有丝分裂就不能开始；如果不是所有的染色体都正确地连接到纺锤体上，后期就无法启动。

就像我们所讨论的其他细胞内装置一样，这些基因组的监控者也易于受到损伤。编码 DNA 修复装置组分的基因如果发生突变，修复能力就会出现缺陷，并使突变等位基因以异常高的速率进行积累。当然，这些突变对基因组所有成分的影响都是相同的，但是在受影响的基因中，较多的还是起生长调控作用的基因。DNA 修复装置受损的直接后果就是肿瘤发展过程中的很多步骤（也许不是所有的步骤）都加速了。每一个步骤不再需要 5 年或 10 年才能完成，它们发生的时间会大大缩短。这将导致肿瘤发生的过程更快地到达终点，临床上癌症的发生率显著增加。

在 DNA 受到损伤后，p53 蛋白在阻止细胞周期运转中起到了关键的作用。在应答多种生理胁迫过程中，p53 可以暂时阻止细胞的增殖；或者也可以激活细胞凋亡程序。毛细血管扩张性共济失调症（ataxia-telangiectasia，AT）不仅可以导致癌症还可以导致其他病症，AT 就是由于遗传了一个有缺陷的基因引起的，正常情况下，这个基因所编码的蛋白质在 DNA 发生损伤时负责通过磷酸化来激活 p53 蛋白从而将 DNA 损伤降低到最低程度。p53 一旦活化，就会促使 p21 蛋白的合成，而 p21 蛋白可以阻止细胞周期的进一步运转。对染色体上的 p53 基因产生影响的突变可以使 p53 蛋白失活。人乳头瘤病毒（HPV）编码的 E6 癌蛋白也可以使 p53 蛋白失活。p53 蛋白功能的丧失使早期的癌细胞摆脱了细胞凋亡的持续威胁。

此外，在许多家族性癌症综合征中，负责编码维持基因组完整性的基因发生了突变，并遗传给了下一代。在这一类癌症综合征中，最早发现的就是着色性干皮病（xeroderma pigmentosum，XP）。患有 XP 的人对阳光中的紫外线照射异常敏感，这是由于他们从上一代遗传了有缺陷的基因拷贝，而在正常情况下，这些基因编码的蛋白质负

责检测 UV 导致的 DNA 损伤，清除受到损伤的碱基，用在接触阳光前就预先存在的碱基去替换那些受到损伤的碱基，有 10 个或更多的蛋白质在上述过程中发挥作用。阳光会导致 XP 患者出现数百处的皮肤损伤，其中有一些损伤最终会发展为皮肤癌。

BRCA1 和 *BRCA2* 基因之所以为人们所熟知，是因为如果遗传这些有缺陷的等位基因，就会对乳腺癌和卵巢癌产生易感性，而在正常情况下，这两种基因编码的蛋白质负责修复双链 DNA 的断裂。遗传性非息肉性结直肠癌（herediary nonpolyposis colorectal cancer，HNPCC）就是由于从上一代遗传了四个特定基因中的任何一个的缺陷形式，而在正常情况下，这四个基因负责协调 DNA 错配修复。图 13.26 显示的是起到保护染色体作用的各种监控系统以及发生在这些监控系统中的可以导致癌症的各种突变。

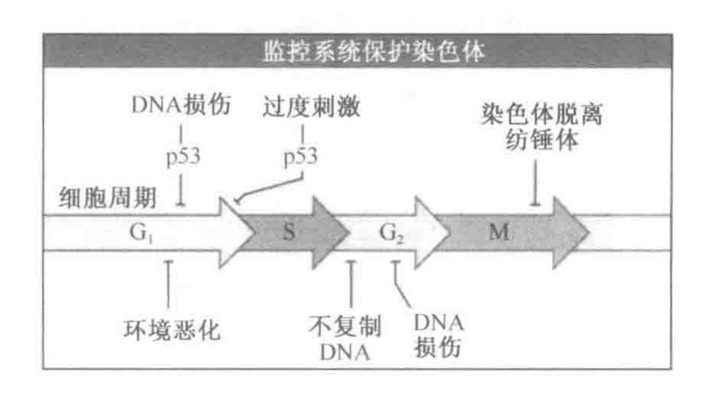


图 13.26　细胞有很多系统监控细胞的外部环境以及整个细胞周期中染色体的状态。如果细胞没有进行必要的修复，这些监控系统可以延缓或终止细胞分裂。

最后，绝大多数人类癌细胞都是非整倍体，它们在逐渐癌变过程中的某一点上丧失了正常的二倍体核型。一些人认为，这种非整倍性代表了另一条途径，癌细胞通过这条途径可以不断地对染色体进行重新组合（reshuffling chromosomal card），使染色体与缺陷染色体臂的比例更有利于恶性生长。事实上，来自一些类型的癌症的证据表明，每一个恶性生长的细胞都确实表现出遗传不稳定性，这种遗传不稳定性是在 DNA 序列水平或核型水平体现出来的。

这种遗传不稳定性可能代表了癌细胞中的一种缺陷，对于肿瘤的恶性生长而言，这种缺陷与特定生长调控基因的缺陷是同等重要的。

13.12　癌细胞可以获得永生

关键概念

- 癌细胞通过使抑癌基因失活从而避免衰老。
- 癌细胞会到达一个危机点（crisis point），在危机点时，许多癌细胞都会死亡。
- 幸免于危机的细胞可以获得永生。
- 除非端粒酶活化，否则端粒会随着细胞的分裂逐渐缩短。
- 当端粒变得很短以至于无法保护染色体时，染色体就会发生融合，这会诱导危机的爆发。
- 大多数癌细胞会激活端粒酶的转录，因此就能够逃脱死亡。

癌基因和抑癌基因可以解释许多有关癌细胞生长失控的现象，但有一个关键的方面却不能解释。在 13.2 癌细胞有很多表型特征中，我们提到癌细胞具有无限增殖的潜能，

而培养中的正常细胞的分裂次数则是有限的。当正常细胞停止分裂后，就进入一种静止状态，这个状态被称为**衰老**（**senescence**）。而人类细胞可以通过使 *p53* 和 *Rb* 抑癌基因失活来逃避衰老。一旦 *p53* 和 *Rb* 抑癌基因失活，细胞就会继续生长一段时间，然后才会出现**危机**（**crisis**），在这个危机点也会有大量的细胞死亡。细胞中偶尔会有一个克隆度过危机并开始快速生长；这时，这些细胞就获得了无限的复制能力，也就是说，它们可以无限增殖，是永生的细胞。在人类肿瘤发展过程中，很多这样的步骤可能也会出现在癌细胞永生化产生之前。

一个细胞系（cell lineage）所具有的"记录"它所经过的复制倍增次数的能力很难和癌基因及抑癌基因的作用相协调。这些基因涉及接受和加工细胞从细胞外空间不断接受到的信号，并涉及对这些信号做出反应。然而，正常细胞所具有的记录细胞倍增代数的能力则表明，在细胞内有一些不依赖于细胞外环境的"细胞钟"（cellular clock）在发挥作用。

人们发现，细胞的这种自动计数装置位于染色体末端的**端粒**（**telomere**）中。端粒结构是由重复上千次的六聚体核苷酸（hexanucleotide）序列组成的。端粒 DNA 和结合在上面的端粒特异性蛋白共同发挥作用，会防止染色体之间的末端融合（end-to-end fusion）。

然而，细胞中的 DNA 复制装置不能如实地复制端粒 DNA 的末端结构。所以，细胞每经过一次 S 期，端粒 DNA 就会缩短 100～150 个核苷酸（nucleotide），如图 13.27 所示。最终，经过长时间连续的生长与分裂周期后，端粒会变得非常短，以至于不能有效地保护染色体 DNA 的末端结构。由此而产生的染色体末端融合似乎带来了灾难性的后果，诱发细胞出现危机。

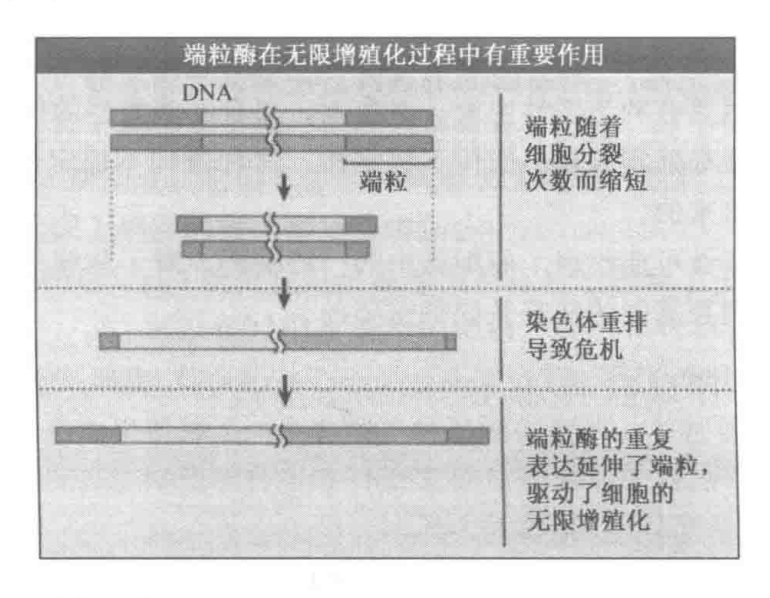


图 13.27 经过许多次细胞分裂后，缩短的端粒会使染色体失去稳定性。缩短的端粒使染色体易于发生灾难性的重组。在癌细胞中，端粒酶恢复表达，使染色体末端的长度维持不变，从而使细胞可以继续分裂。

癌细胞必须要突破这个高度有效的"屏障"才能继续增殖，它们是通过使**端粒酶**（**telomerase**）去阻遏（derepression）来实现这个目的。正常情况下，只有在早期胚胎细胞和位于睾丸的精细胞中才能检测到高水平的端粒酶表达。在这些细胞中，端粒酶用

来维持并延长端粒DNA。然而，在多达90%的人类癌细胞中，端粒酶存在高水平的表达；这是由于在肿瘤发展过程中的某一点上，编码端粒酶的基因去阻遏所造成的。很明显，在这些癌细胞中端粒酶功能的持续存在对于它们的增殖是至关重要的。如果去除癌细胞中的端粒酶，它们就会再次出现危机并大量死亡。这清楚地表明，癌细胞的增殖除了依赖于癌基因的过度表达以及抑癌基因的失活外，也同样依赖于端粒酶。

13.13 通过血管生成作用获取维持生存所必需的营养

关键概念

- 肿瘤生长受到营养获取和废物清除机制的限制。
- 肿瘤可以刺激血管生长（血管生成作用），这使得肿瘤不断扩大。

在早期小肿瘤团中的细胞所具有的增殖能力会受到许多因素的抑制，其中最重要的因素就是能否获取足够的血液供应。据估计，最初形成的肿瘤，即**原发性肿瘤**只能长到0.2mm就会在获取营养和氧气方面受到限制；同时，这些原发性肿瘤中的细胞在清除代谢废物和二氧化碳方面也开始遇到困难。经历极度缺氧状态的细胞会被诱导进入凋亡程序。

如果肿瘤可以成功获得一个血管网络，这些问题就迎刃而解了。一旦肿瘤获得了血管网，这些血管就可以解决营养和氧气的供应问题以及代谢废物的清除问题。与正常发育的组织不同，以肿瘤为代表的病理性组织不会自发地与由静脉和动脉组成的血管网络协同生长。肿瘤细胞必须要能够诱导周围正常组织中的血管向肿瘤内部生长。

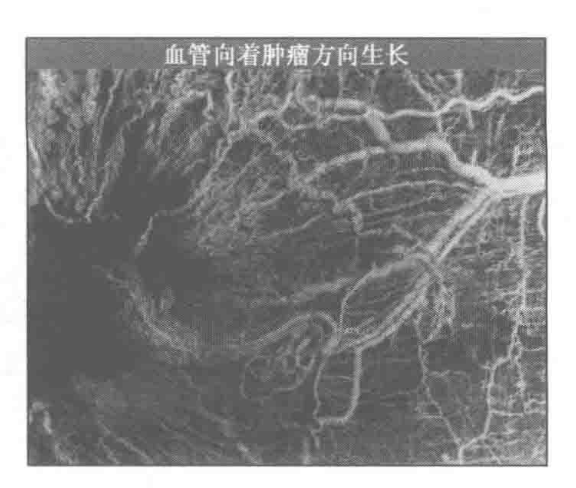


图13.28 血管向大鼠肌肉中的一个肉瘤生长。肉瘤就是图的左边那块黑的区域。照片由Boston儿童医院karp家族实验室的Judah Folkman，Louis Heiser，and Robert Auckland提供。经许可复制自Marx，J. 2003. Science，301：452-454。© AAAS。

这种发展新血管的过程被称为**新血管生成作用（neo-angiogenesis）**，或简单地被称为**血管生成作用（angiogenesis）**。血管生成作用开始于肿瘤细胞分泌一种被称为血管生成因子（angiugenic factor）的生长因子，血管生成因子一旦从肿瘤细胞中分泌出来就会作用于周围正常组织中形成毛细血管（capillaries）的内皮细胞。由于血管生成因子的作用，这些内皮细胞开始增殖并深入到肿瘤内部，从而最终形成能够支持肿瘤进一步生长的血管，如图13.28所示。

很明显，在早期的小肿瘤中，癌细胞会以一个恒定的速率进行增殖，这会持续好几年。尽管如此，肿瘤作为一个整体在这几年里体积却不会增加。由于缺乏血液供应，这个肿瘤中的细胞会因为缺氧以及自身代谢废物的毒性作用而死亡，其死亡的速率与其形成的速率相同。上述状态确实是我们体内所有组织中的早期肿瘤的最终命运。在这个停滞时期，扩散过程使这个小肿瘤从周围有丰富血管的组织中获取氧气和营养从而满足自

身的需要。

经过几年这样无意义的细胞分裂周期后，这个小肿瘤中的一些细胞突然获得了刺激血管生成的能力。这时，这个肿瘤作为一个整体又开始了快速的增殖。这个在肿瘤多步骤的发展过程中发生的突然性的行为转变被称为**血管生成切换（angiogenic switch）**。在其他肿瘤中，血管的获取并不是由于肿瘤发展过程中一个单一的、没有联系的事件的结果（像血管生成切换）。相反，随着肿瘤的发展，肿瘤细胞逐渐获得了生成血管的能力。

控制血管生成作用的过程涉及癌细胞和附近正常细胞之间的相互作用，这些正常细胞被募集到肿瘤中并被癌细胞选中。人们认为，除了癌细胞直接释放的血管生成因子外，周围的成纤维细胞和**巨噬细胞**也释放一些其他的关键因子。它们共同作用，从而诱导血管网的生成，这种血管网可以满足肿瘤的所有需要，并使肿瘤开始获得无限的营养和氧气供应。它们也可以诱导淋巴管伸入到肿瘤中，这些淋巴管可以协助清除肿瘤中的废物和组织液（interstitial fluids），但是相对而言，它们所起的作用与血管相比似乎相对要小一些。

我们可以根据肿瘤所募集的毛细血管的密度来对它们进行分级。那些具有高密度毛细血管网的肿瘤被称为是高度血管化的（highly vascularized），这种高度血管化的肿瘤对于病人来说是个坏兆头，因为它表明肿瘤细胞在快速生长。更为不幸的是，这些血管的存在表明这种肿瘤已经开始进入血管并能够迁移到体内其他部位。

13.14 癌细胞可以侵入到机体的其他部位

关键概念

- 原发性肿瘤中的一些细胞可以进入血管和淋巴管（内渗）。
- 内渗过程通常需要突破周围组织的屏障。
- 在沿血管扩散过程中存活下来的细胞可以附着到其他器官。
- 转移（metastasis）通常会导致个体的死亡。

肿瘤中的细胞会持续好几年甚至几十年都在原发部位进行增殖。当原发性肿瘤长到一定体积时，它们就能够替代维持生命所必需的组织并损伤对有机体至关重要的生理功能。但是，因癌症而死亡的病人中，只有10%是死于原发性肿瘤；由肿瘤导致的死亡绝大部分是因为癌细胞从原发部位转移到了机体的其他部位。

随着肿瘤的增大，位于肿瘤边缘的一些细胞开始降解一直在限制肿瘤增长的物理屏障。以上皮肿瘤为例，这个屏障是由基底膜组成的，基底膜在正常情况下将上皮细胞层和主要由成纤维细胞及其他间充质细胞组成的基质隔离开（基底膜的细节见15.11 基底膜是特化的细胞外基质）。癌细胞在穿越基底膜后就可以进入血管和淋巴管，这个过程就是**内渗（intravasation）**，这样，癌细胞就可以将血管和淋巴管作为通道从而转移到机体其他部位。

发生转移的癌细胞一旦离开原发部位就会遇到恶劣的环境。很多癌细胞在血液循环系统中死亡或是在远处器官的毛细血管或小淋巴管处附着的时候死亡。但还是有一些细胞成功地脱离了血管或淋巴管，这个过程就是**外渗（extravasation）**，并且在周围组织中立足。在这里，大多数细胞同样也会死亡。然而，在很偶然的情况下，某个癌细胞能够

成功地找到环境适宜的器官，在那里附着并建立一个新的、大的肿瘤细胞群，这个过程就是**转移**（**metastasis**）。

转移生长的部位可能在解剖学上是事先预定好的（例如从原发部位伸向靶组织的血管通路），也有可能是由靶组织中的生长因子环境事先预定好的。结肠癌细胞倾向于在肝脏形成转移灶，由于肝门静脉从结肠直接向肝脏内输送血液。乳腺癌细胞通常在骨骼、大脑和肺部形成转移灶。前列腺癌细胞通常也在骨骼中形成转移灶。出现这些特殊偏好的具体原因还不是很清楚。但是结果是很明显的：这些转移灶导致了与癌症有关的大多数损伤，而且这些转移灶是导致绝大多数癌症患者死亡的原因。

13.15 展望

在接下来的几十年里，癌症研究将同时向几个方向发展。首先，我们将进一步研究细胞中信号转导蛋白的相互作用，这将使我们更深入地了解这些信号通路的运行方式。同时，这些信息也为我们鉴定干预治疗的有效靶点提供了新的动力。

事实上，抗癌药物的发展将会因为许多相关知识和技术的进步而发生显著的改变，这些相关的知识和技术包括：前面提到过的对于癌细胞环路（cancer cell circuitry）的了解；更快地产生靶蛋白三维结构的方法；通过计算机模拟来设计药物的方法，这种新方法将可以避免对成百上千种药物进行耗费人力、财力的高通量筛选（high-throughput screening）；在对药物进行Ⅰ期临床试验前检测候选药物的更好的临床前模型（preclinical model）。同时，随着功能基因组尖端筛选技术的发展，可以将肿瘤分为不同的亚型，这些不同的亚型的肿瘤会对为它们量身定做的新一代药物产生不同的反应。

除了这些更为实用的进展以外，我们还会越来越多地了解有关癌症及其成因的基础理论。例如，我们很有可能会系统地阐明一些控制所有类型人类细胞转化的规律，这些规律可以使我们合理地解释为什么不同系列突变的等位基因在不同类型癌细胞的基因组中可以共存并相互合作。我们将更透彻地理解癌症的发病机理。从传统意义上讲，这依赖于概念性模型，在这些概念性模型中，突变事件是癌症发展中的驱动力。但是，现在很有可能出现的情况是非遗传学机制，主要是炎症反应可能导致一些组织中肿瘤的出现。相应的，我们将对归类于**肿瘤促进**程序的那些非遗传机制是如何与那些在发展中的癌前期细胞（preneoplastic cell）基因组中积累的突变等位基因相互合作从而导致癌症的发生有一个全面的理解。这也将使我们能够更进一步了解人类癌症的因果机制，而目前，除了吸烟诱导的肿瘤外，我们对癌症的因果关系还不太了解。我们所获得的这些信息将通过指导我们改变饮食和生活方式来产生出最大的效益，而我们在饮食和生活方式上的改变最终将大大减少癌症的死亡率，这要比现在生化学家、有机合成化学家及药理学家所能设计出来的治疗现有癌症的药物有效得多。

13.16 总结

肿瘤发展过程代表了许多故事中的一个剧本。正常细胞转化为完全恶性的细胞至少需要约六个步骤的参与；每个步骤都可能涉及细胞基因组的变化以及由此而引起的表型变化。这种复杂性背后的原理很明显，在早期肿瘤的发展道路上存在许多屏障，每一个屏障都会阻止肿瘤向下一个阶段发展。相应的，肿瘤发展过程中的每一个步骤也都代表

了细胞成功地突破了一个阻碍它向侵润性生长状态发展的屏障。

这一系列复杂的抗癌措施显得非常有效。可能人体内大多数的早期肿瘤在人的一生中都无法成功穿越所有步骤而成为在临床上可检测到的并可以威胁生命的恶性肿瘤。所有的老年人似乎在全身各种器官中都带有上百个甚至上千个前恶性细胞（premalignant cell）的克隆，但它们向癌症方向的发展受到了贯穿所有细胞和组织的防护装置的阻挡。在这其中就包括由于癌基因活化而诱导细胞衰老和凋亡的机制；也包括阻止早期肿瘤接触血管的机制；还包括对具侵润性的肿瘤细胞进行物理限制的机械性屏障。

然而，癌症依然会发生，在西方社会中，有 20% 的人最终会患上癌症。很明显，癌症的发病率会因为不合理的饮食和生活习惯而显著增加。现在我们知道诸如吸烟、高脂肪膳食、高肉类膳食、接触射线、过度肥胖以及不生育等此类因素都会极大地增加各个器官罹患癌症的风险。我们已知或已推测，这些因素可以直接或间接诱导能产生基因突变的遗传学变化，而这些突变基因在肿瘤发展中发挥作用。

在这些可能导致癌症的因素中，吸烟是最主要的因素。例如，近几年美国因癌症而死亡的患者中，有多达 30%的人有吸烟史。在美国，据估计，戒烟及改善饮食和生活习惯可以将癌症的发病率降低 50%，并因此可以减少癌症的死亡率。即使我们了解了所有已知的因果机制，但对于基因变化和肿瘤发展之间的联系还有许多关键的难题没有解决。其中之一就是肿瘤发展的晚期事件（也就是侵润和转移）与控制这些步骤的基因之间的关系。调控侵润和转移这两个特征的遗传学模型还有待阐明。

癌症研究的目标就是要最终能够将正常细胞转化为高度恶性化的细胞所需要的所有缺陷都完整地列举出来。这将使癌症研究者能够给癌细胞写一部“传记”，在这部“传记”中，癌细胞形成的每一步都得到了详细并且高度精确的记载。最终，随着这些复杂通路的细节得到阐明，我们将找到许多用于治疗的靶分子。

参考文献

13.2 癌细胞有很多表型特征

研究

Hayflick, L., and Moorhead, P. S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* v. 25 p. 585–621.

13.4 当某些基因发生突变时就会产生癌细胞

研究

Martin, G. S., 2001. The hunting of the Src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 467–475.

Lee, J. O., Russo, A. A., and Pavletich, N. P., 1998. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPVE7. *Nature* v. 391 p. 859–865.

13.5 细胞基因组中包含有许多原癌基因

研究

Shih, C., Shilo, B. Z., Goldfarb, M. P., Dannenberg, A., and Weinberg, R. A., 1979. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 76 p. 5714–5718.

Shih, C., and Weinberg, R. A., 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* v. 29 p. 161–169.

13.6 消除肿瘤抑制因子的活性需要两个突变

综述

Knudson, A. G., 2002. Cancer genetics. *Am. J. Med. Genet.* v. 111 p. 96–102.

Sherr, C. J., 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* v. 116 p. 235–246.

13.7 肿瘤的发生是一个复杂的过程

综述

Foulds, L., 1954. *The Experimental Study of Tumor Progression*, Vols. I–III. London: Academic Press.

Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* v. 87 p. 159–170.

研究

Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A., 1983. Tumorigenic conversion of primary embryofibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* v. 304 p. 596–602.

Nowell, P. C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* v. 194 p. 23–28.

Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallace, R., and Leder, P., 1987. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: Synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* v. 49 p. 465–475.

13.8 生长因子激活细胞的生长和增殖

综述

Aaronson, S. A., 1991. Growth factors and cancer. *Science* v. 254 p. 1146–1153.

Shi, Y., and Massague, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* v. 113 p. 685–700.

13.9 细胞受到生长抑制后可退出细胞周期

综述

Evan, G. and Littlewood, T., 1998. A matter of life and cell death. *Science* v. 281 p. 1317–1322.

13.10 抑癌因子会阻止细胞不恰当地进入细胞周期

综述

Massagué, J., 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* v. 432 p. 298–306.

13.11 具有DNA修复和维护作用的基因的突变会增加总突变率

综述

Kastan, M. B., and Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* v. 432 p. 316–323.

13.12 癌细胞可以获得永生

综述

Cech, T. R., 2004. Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* v. 116 p. 273–279.

13.13 通过血管生成作用获取维持生存所必需的营养

综述

Bergers, G., and Benjamin, L. E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* v. 3 p. 401–410.

桑建利　译

第6篇　细 胞 通 讯

第14章　细胞信号转导原理

第15章　细胞外基质和细胞粘连

第14章　细胞信号转导原理

Melanie H. Cobb 和 Elliott M. Ross
The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas

本章概要

14.1　导言
14.2　细胞信号转导基本上为化学反应
14.3　受体感受各种的刺激源于有限的细胞信号组成成分
14.4　受体具有催化和放大作用
14.5　配体的结合改变了受体的构象
14.6　在信号转导通路和网络中，信号被分类和整合
14.7　细胞信号转导通路可被认为是一系列的生化反应
14.8　支架结构增加了信号转导效率同时增强了信号转导的空间定位特异性
14.9　独立的模块结构域决定蛋白质-蛋白质相互作用
14.10　细胞信号具有显著适应性
14.11　信号转导蛋白经常多样化表达
14.12　活化与钝化反应是分开的且受到独立调控
14.13　细胞信号系统使用变构效应和共价修饰
14.14　第二信使为信息转导提供了便捷的途径
14.15　所有真核细胞中钙离子信号都具有多种作用
14.16　脂类和脂源性的化合物是信号分子
14.17　PI_3激酶调节细胞形态与基本生长及代谢的活化
14.18　通过离子通道受体的信号转导非常迅速
14.19　核受体调节转录
14.20　G蛋白信号转导模块被广泛使用与高度适应
14.21　异源三聚体G蛋白调节多种效应子
14.22　异源三聚体G蛋白受到一个可调节的GTPase循环所调控
14.23　小的单体GTP结合蛋白是多用开关
14.24　蛋白磷酸化/去磷酸化是细胞中的一个主要调控机制
14.25　双向蛋白磷酸化系统是信号转导的中转装置
14.26　蛋白激酶的药物抑制剂可用于研究和治疗疾病
14.27　磷蛋白磷酸酶与蛋白激酶作用相反并受到单独调控
14.28　泛素和泛素样蛋白引起的共价修饰是调控蛋白功能的另一种途径
14.29　Wnt通路在成体发育和其他过程中对细胞有重要调控作用
14.30　酪氨酸蛋白激酶调控多种信号转导机制
14.31　Src家族蛋白激酶与酪氨酸蛋白激酶受体协同作用
14.32　MAPK是许多信号通路的中枢
14.33　周期蛋白依赖性蛋白激酶调控细胞周期

14.1　导言

从原核生物到动植物的所有细胞，都能以确定的方式感应所处环境的各种刺激并产生应答，使它们能以符合有机体需求的形式生存、适应变化与行使功能。这里的应答并不是简单地对所处环境变化做出一种物理上或代谢上的反应，而是细胞表达一系列感应蛋白，即**受体**。这些受体特异性地识别胞外刺激。为了对胞外刺激做出反应，受体可调控胞内各种调节蛋白的活性，进而启动细胞的特异性应答。感应胞外刺激并将特定信息传递给胞内靶分子的过程被称为细胞**信号转导**。

细胞对所有种类的刺激都能做出反应。微生物对营养、毒素、温度、光和其他微生物分泌的化学信号做出反应。多细胞生物的细胞能够表达特异性的受体来感应胞外信号，包括激素、神经递质、**自分泌**和**旁分泌**分子（来自分泌细胞或其周围细胞的激素样化合物）、气味、调节生长或分化的分子和相邻细胞外表面的蛋白。一个哺乳动物细胞通常表达约 50 种受体来感应不同输入信号，这样哺乳动物可表达数以千计的受体。

尽管细胞生活方式多样，不同细胞可以感应的信号分子数量巨大，但是，基本的蛋白质分子和参与信号转导的机制在活细胞中是保守的，如图 14.1 所示。

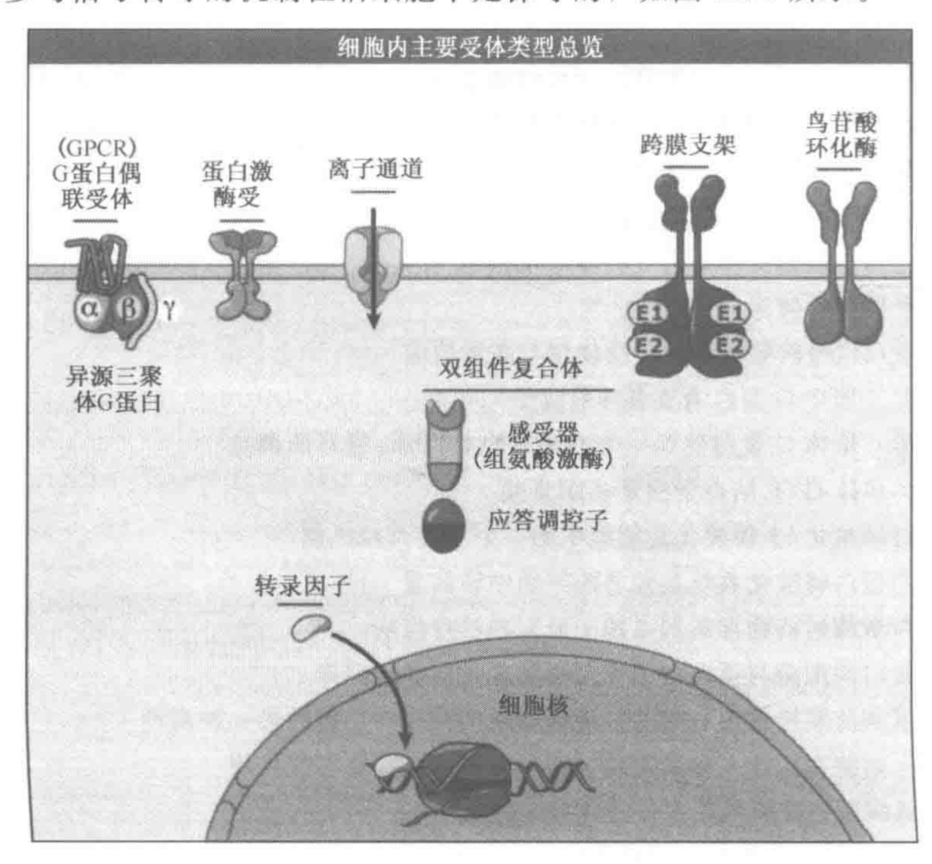


图 14.1　受体形成了数量很少的家族，它们具有共同的作用机制和相似的结构。

• **G 蛋白耦联受体**由 7 次跨膜螺旋组成，能够将异源三聚体 **G 蛋白**的 GTP 结合蛋白活化，它位于质膜的内表面，可以将信号传递给多种细胞内蛋白。

• **蛋白激酶受体**通常是单跨膜的二聚体，它们能够**磷酸化**其细胞内底物，并因此改变靶蛋白的构象和功能。这些蛋白质通常包含蛋白质相互作用结构域，在质膜内表面组成信号传递复合体。

• 磷蛋白磷酸酶通过去除由蛋白激酶加上的磷酸基团而逆转蛋白激酶的作用。

• 其他单跨膜酶，如**鸟苷酸环化酶**，其构型与蛋白激酶受体相似，但其酶活性不同。鸟苷酸环化酶催化 GTP 生成 3′，5′-环化鸟苷酸，由此传递信号。

• **离子通道受体**，虽然具体结构不同，但通常都是多聚体，每个亚基都包含若干跨膜区。这些亚基通过改变它们的构象和相关的定位来使离子穿过中心孔道。

• **双组分系统（two-component system）**可能是跨膜的，也可能位于胞质中。其亚基数量是可变的，但是每个双组分系统都包含一个组氨酸激酶结构域，或是一个信号分子调控的亚基和一个包含可磷酸化的天冬氨酸（Asp）残基的应答调节因子。

• 一些受体是跨膜**支架**，它们改变构象或者它们细胞内支架结构域的低聚化，来应答细胞外的信号分子或**配体**，并因此将相互作用的调节蛋白募集到膜上的一个共同位点。

• **核受体**是**转录因子**，通常是异源二聚体，在相关分子活化前，它可能存在于胞质中，也可能始终定位于核中。

信号转导的生化过程在细胞中惊人地相似。细菌、真菌、植物和动物都使用相似的蛋白和多蛋白组合来感应和传递信号。例如，在植物、真菌和动物中都能发现进化上保守的异源三聚体 G 蛋白和 G 蛋白耦联受体。3′，5′-环腺苷酸是一种细菌、真菌和动物细胞内的信号分子；Ca^{2+} 在所有真核细胞中发挥着相似的作用。在所有细胞中蛋白激酶和磷蛋白磷酸酶都参与酶活性调节。

虽然信号转导的基本生化组分和过程是保守的和反复使用的，但存在着广泛不同的模式，而且涉及许多不同的生理目的。例如，在细菌、真菌和动物中 cAMP 由不同的酶合成，并在每种有机体中作用于不同的蛋白质；在一些黏液菌中它是一种**信息素**。

细胞经常使用同一系列的信号蛋白来调控一个特定的过程，如转录、离子运输、运动和新陈代谢。这些信号通路组成信号网络，使细胞能整合多种信号输入产生的应答而显示出功能。目前已能确定信号转导网络中一条通路里和通路间保守的反应顺序，这种网络与电脑的电路设计相似，包括放大器、逻辑电路、反馈和前馈控制以及储存。

本章首先讨论了细胞信号转导的原理和策略，然后讨论了保守的生化组分和信号通路反应以及这些原理是如何应用的。

14.2 细胞信号转导基本上为化学反应

关键概念

- 细胞可以检测到化学和物理信号。
- 物理信号一般在受体水平被转化为化学信号。

细胞感受的大部分信号是化学信号，当感受到物理信号时，通常信号在受体水平上

转化为化学信号而被检测。例如，视觉的光感受体视紫红质由视蛋白组成，它与有色的维生素 A 衍生的顺式视黄醛（**发色团**）相结合。当顺式视黄醛吸收光子，就会**光异构化**为反式视黄醛，进而成为活化视蛋白的配体（视紫红质的信号转导的细节见 14.20 G 蛋白信号转导模块广泛使用与高度适应）。与此相似，植物通过感光蛋白光敏色素和隐花色素来感受红光和蓝光，它们通过四吡咯或黄素发色团检测光子。花隐色素同系物也在动物中表达，它们可能介导了昼夜间的调节。

一些受体直接对物理信号应答。压力感应通道在所有有机体中以一种或几种形式存在，通过改变它们的离子导率来介导对压力或切力的应答。在哺乳动物中，听觉是由内耳毛细胞上的机械性控制通道间接介导的。一种钙黏着蛋白的细胞外结构域可对声波振动应答，产生开启通道的力。

细胞通过一些细胞表面蛋白包括整合蛋白来感受机械力。整合蛋白通过与其他细胞和外界环境中分子复合体相接触将信号传递给细胞。

物理应答受体的一个主要类群是由感应电压的通道组成的。另一个让人感兴趣的类群是热/痛感应离子通道；某些热感应离子通道也对化合物应答，如辣椒素，一种尖辣椒中有辣味的脂类刺激物。

无论信号是物理的还是化学的，受体都会启动改变细胞行为的反应。在本章后续部分，我们将讨论这些作用是如何产生的。

14.3 受体感受各种的刺激源于有限的细胞信号组成成分

关键概念

- 受体包含一个配体结合结构域和一个效应子结构域。
- 受体模块化使多种信号采用有限的调控机制。
- 细胞能表达不同的受体来结合相同的配体。
- 依据受体上的效应子结构域，相同配体可以对细胞产生不同的作用。

受体能够介导大量的种类多样的细胞外信号分子的应答；因此，细胞必须表达大量种类的受体，每种都能够与其胞外配体相结合。此外，每种受体必须能够启动一种细胞应答。受体因此包含两个功能**结构域**：一个**配体结合结构域**和一个**效应子结构域**，它可能与蛋白质中已知的结构域相应或不相应。

配体结合和效应子功能的分离使受体结合不同的配体，通过少量效应子结构域的活化产生一定量的进化上保守的胞内信号。实际上，受体家族的数量是有限的，这与它们保守的结构和信号转导功能有关（图 14.1）。

受体的两个结构域本质上存在着一些有意义的相关性。例如，一个细胞能够通过调控一种受体的合成或降解，或者通过调控受体的活性，来控制其对一个胞外信号的应答（见 14.10 细胞信号具有显著适应性）。

此外，一种应答的性质通常是由受体和它的效应子结构域决定的，而不是由配体的任何物理化学性质决定的。图 14.2 阐明了一个概念，一种配体可以与不止一种受体结合，并可引起多种应答，或者是若干不同配体通过与功能上相似的受体结合而产生相同的作用。例如，神经递质乙酰胆碱同两类受体结合，一类受体是离子通道；另一类受体

可调节 G 蛋白。相似的，类固醇激素既与通过结合染色质调控转录的核受体结合，也与质膜上的受体结合。

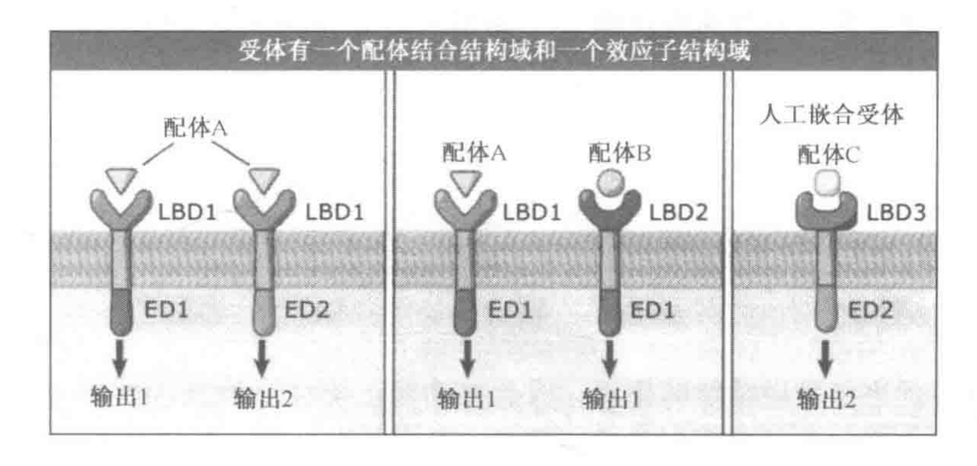


图 14.2 受体可以看做由两个功能结构域组成，一个配体结合结构域（LBD）和一个效应子结构域（ED）。两个结构域性质表明，两种应答不同配体的受体通过活化相似的效应子结构域能够产生相同的功能（中），或者一个细胞能够表达两种效应子结构域不同的受体亚型应答具有不同细胞效应的相同配体（左），对相同配体应答可产生由不同效应子结构域介导的特定细胞效应。这也表明可以人为地创造一种具有新的性质的人工嵌和受体。

相反，当多种配体同生化种类相同的受体结合时，它们会产生相似的细胞内应答。例如，常见到细胞表达几种特异的受体刺激胞内信号分子 cAMP 的产生。细胞上受体的作用能够通过细胞生物学和特点时间点的细胞状态来确定。

配体结合和效应子结构域可能独立地应答各种选择压力。例如，哺乳动物和无脊椎动物的视紫红质通过不同的效应子 G 蛋白（分别为 Gi 和 Gq′）转导信号。另一个例子是，动物中的钙调蛋白，它在动物中是一种小的钙结合调节蛋白，在植物中作为大蛋白中的一个特定的结构域。

受体具有两个结构域使细胞能够独立地调控配体的结合和配体的效应。**共价修饰**或变构调控能够改变配体结合的亲和力，这是配体结合受体从而产生信号的能力。我们将在 14.13 细胞信号系统使用变构效应和共价修饰中进一步讨论这些概念。

受体的分类可以根据其结合的配体，也可以根据它们传递信号的方式。信号输出是效应子结构域的特征，通常与整体结构和序列保守性非常相关（根据功能分类的受体家族是本章后半部分的组织基础）。尽管如此，分类受体在药理学上，根据它们对配体的特异性，显著地有利于理解内分泌和神经元系统，也有利于对药物的多种生理应答加以分类。

细胞中通常不表达的受体进行表达能对相应配体做出充分的应答。由于细胞表达其他由受体传递胞内信号所必需的成分这种应答时常发生。这种应答的精确性反映在细胞生物学中。在实验上，通过引入编码受体的 cDNA 可诱导对一种化合物的应答。例如，哺乳动物受体可以在酵母中表达，酵母可对受体的配体做出应答，因此为新的化学药品（药剂）活化受体引起分泌提供了一种方式。

最后，有可能将一种受体的配体结合结构域和一种不同的受体的效应子结构域融

合，创造出嵌和受体（见图 14.2）。这种嵌和受体能够介导对配体的新的应答。通过对配体结合结构域的遗传修饰，受体能够被重新改造来应答新的配体。因此，科学家能够通过非生物的化合物来操纵细胞功能。

14.4 受体具有催化和放大作用

关键概念

- 受体可以增加关键调节反应的速率。
- 受体可成为分子放大器。

受体具有促进细胞内功能的作用，因此在功能上类似于酶或者催化剂。一些受体，包括蛋白激酶、蛋白磷酸酶和鸟苷酸环化酶，其自身就是酶，是典型的生化催化剂。然而，更常见的是受体利用较小的配体结合能量来促进选择性能量推动的反应。例如，组成通道的受体催化离子跨膜转运，这个过程是由不同的离子泵形成的电化学电势驱动的。G 蛋白耦联受体和其他鸟嘌呤核苷酸交换因子催化 G 蛋白上 GDP 和 GTP 间的转换，这是一种受细胞核苷酸能量平衡支配的需能过程。转录因子加快了转录起始复合体的形成，但是转录本是由 ATP 和 dNTP 水解的多个步骤供能驱动的。

作为催化剂，受体增大了反应速率。大部分信号传递包括**动力学**的而不是**热力学的调控**；即信号转导事件改变了反应速率而不是它们的平衡（见下一节）。因此，信号转导同新陈代谢调控相似，根据速率选择特异反应，而热力学的驱动力只起到支持作用。

在所有的信号转导反应中，受体利用它们的**催化活性**发挥分子放大器的作用。受体直接或间接地产生一种在能量上以及单一受体募集的分子的数量上都十分大的化学信号。分子水平上的放大是受体和细胞信号转导通路中许多步骤的一个标志。

14.5 配体的结合改变了受体的构象

关键概念

- 受体能够以活化或钝化构象存在。
- 配体结合驱使受体转变为活化构象。

一个信号分子与配体结合结构域的结合如何增强效应子结构域的活性是受体功能的一个核心的机制问题。其关键是受体可以以多种分子构象形式存在，有些构象对于信号传递是有活性的，而有些则是无活性的。在这些构象之间配体改变着构象平衡。受体在有无活性的异构化中发生的结构的变化以及配体结合是如何启动这些改变，是生物物理学研究中令人兴奋的领域。尽管如此，基本观念可以简单被描述为是配体结合引起的构象异构化和效应子结构域的耦联。

配体究竟如何激活（或不激活）一个受体？受体的大部分基本调控活动可以通过一个简单的图解来描述，认为受体具有两种可相互转化的构象，无活性（R）和有活性（R^*）。R 和 R^* 处于平衡，用平衡常数 J 表示。

$$R \underset{}{\overset{J}{\rightleftharpoons}} R^*$$

因为未与配体结合的受体通常具有最低程度的活性，$J \ll 1$，而且未与配体结合的受体大部分时间都处于 R 状态。当一个信号分子（L）结合后，它会促使受体向活化构象 R^* 转变，活化构象使效应子结构域具有功能。因此，结合配体的受体大部分时间都处于活化的 R^* 状态。

$$
\begin{array}{ccc}
R + L & \overset{J}{\rightleftharpoons} & R^* + L \\
K \updownarrow & & \updownarrow K^* \\
R \cdot L & \underset{}{\overset{J^*}{\rightleftharpoons}} & R^* \cdot L
\end{array}
$$

配体活化受体的机制是它对受体活化和钝化构象的相对亲和力的一个简单调节。配体能够同受体的两种构象结合，在这里用常数 K 表示 R，用 K^* 表示 R^* 来描述它们的关系。对 R^* 构象的亲和力大于对 R 构象亲和力的配体是活化因子。如果 K^* 大于 K，这种配体就是促效因子激动剂。根据热力学第二定律，一个耦联平衡系统显示出通路独立性：两种状态之间的净释放能量之差是不与中间发生的反应相关联的。对于受体，从 R 到 R^*L 的任何通路都具有相同的能量释放变化，而且每条通路的平衡常数都是相等的。以上面为例，单独通路表示为：

$$J \cdot K^* = K \cdot J^*$$

所以，$J^*/J = K^*/K$。

因此，如果优先同 R^* 构象结合（也就是，$K^*/K \gg 1$），那么配体结合将使构象转变为 R^* 状态以达到一个相等的程度（即，$J^*/J \gg 1$）。通过配体的一个饱和浓度产生的相对活化，J^*/J，将完全等同于配体使受体变为活性构象的相对选择性，K^*/K。通常，这个论证对任何调节性的配体在调控一个蛋白活化时都是正确的。

这个模型简单且在数量上解释了许多受体和它们的配体的性质。

• 首先，为了平衡，J 必须大于 0。因此，甚至是未与配体结合的受体也具有一些活性。过表达的受体通常会表现出其固有的低活性。

• 因为生理状态下在没有配体时受体几乎是钝化的，所以 J 必须远小于 1，甚至可能低于 0.01；大多数受体在没有激动剂时具有活性的不到 1%。

• 配体可以在 R 和 R^* 间选择性变化。其活化的能力也是变化的。一些配体优先作为激动剂，能够促进可估计的 R^* 的形成。其他已知的**局部激动剂**，将会促进稍小于最大程度的活化。对一种配体的结构进行化学处理通常会改变其作为激动剂的活性。这些关系如图 14.3 所示。

• 与 R 和 R^* 状态都能很好结合的配体不会引起活化作用。尽管如此，这样的配体可能仍然会占据结合位点，并因此竞争性抑制一种有活化作用的配体的结合。这样的竞争抑制子作为**反向激动剂**，常常在各种疾病状态下用做阻止一种不希望被活化的受体的药物。

• 相对于 R^*，优先与 R 结合的配体会进一步使构象平衡向钝化状态转变，并会引起净抑制（net inhibition）。这样的受体被称为反向激动剂。因为 J 已经很低，如果一种受体被过表达或受体被突变从而增强其固有的活性（即突变体增大了 J），反向激动剂的作用才可能被察觉到。

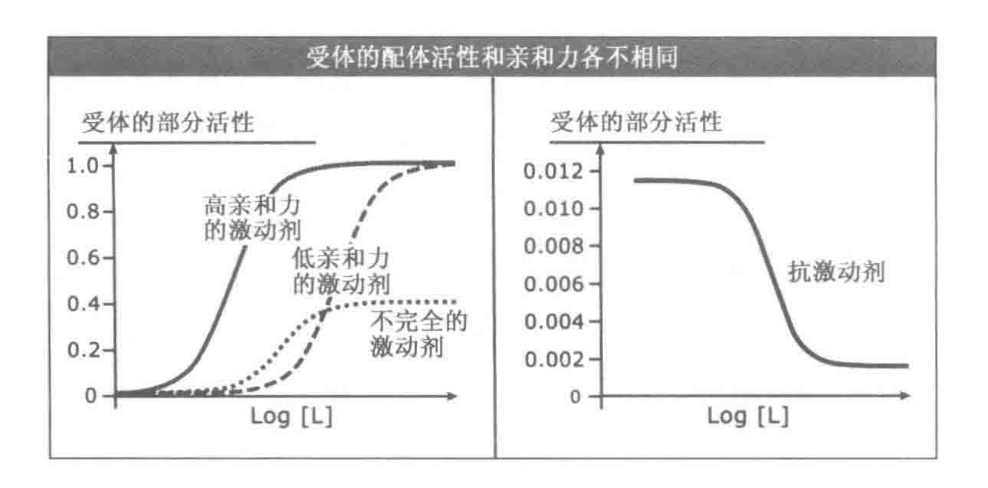


图 14.3　这里显示的两种简单的受体状态模型描述出受体及其不同的调节配体所表现出的多种行为。左面显示的是受体接触两种亲和力不同的激动剂和一种不完全的激动剂后的分级活性。右面显示的是一种抗激动剂的作用。如果未与配体结合的受体低活性能作为重要的生物学活性被检测到，那么抗激动剂对它的抑制也将很容易被检测到。

• 一种激动剂刺激受体所能达到的程度与其亲和力无关。激动剂和抗激动剂无论亲和力高低可能都可以结合。亲和力决定了受体的敏感性，即受体能检测到的最低配体浓度是多少。受体对自然的调节配体的亲和力变化非常大，生理性 Kd 值对于激素可低至$<10^{-12}$，对于化能自养菌可大到 10^{-3}。敏感性的另一个方面是当配体浓度增大时，受体如何突然或逐渐活化。上面的模型预示着，受体会在 0.1～10 倍其 Kd 值的激动剂浓度下被活化。多种细胞机制能够将这个约 100 倍的常规反应范围转变为一个更缓慢进行的反应或一个急剧的开关似的反应。

• 这个模型只是描述了平衡，它未预测配体结合或释放的速率或是引起活化的构象异构化。

这个模型显示了受体作用的三个重要方面是如何独立确定的。如前所述，决定配体功能最低浓度的配体的亲和力同配体促使受体活化的净效力是相互独立的。反应速率也在很大程度上独立于其他两种性质。受体在应答输入信号、新陈代谢、细胞的发育阶段等方面的功能上都是独立地进行调控的。这样的信号输入调控对整个细胞的信号转导协作是非常重要的。例子和机制将在本章介绍。

14.6　在信号转导通路和网络中，信号被分类和整合

关键概念

- 信号转导通路通常有多个步骤，分散和（或）会聚。
- 分散使多种信号成为单一的信号。
- 会聚使信号整合与协同。

受体很少直接作用于它们最终调控的细胞内过程。受体通常是启动包含中间蛋白和小分子连续的调控事件。通过多步骤信号转导通路，细胞放大信号、调整信号转导动力学、插入调控点、整合多种信号并将信号传递给不同的效应子。

分支通路使细胞能够整合多种进入信号，并能引导信息到达正确的调控点。如图

14.4 所示，分支能够被会聚，通过多种信号调控共同终点，或被分散，通过单一通路分支来调控多个过程。在多细胞有机体中，分散的分支（divergent branching）使一种单一的激素受体在不同的细胞和组织中启动不同细胞适宜的反应模式。分散的信号传递也使受体以量的不同在质上调节细胞不同的应答，每个信号都依赖于中间通路中的信号放大。

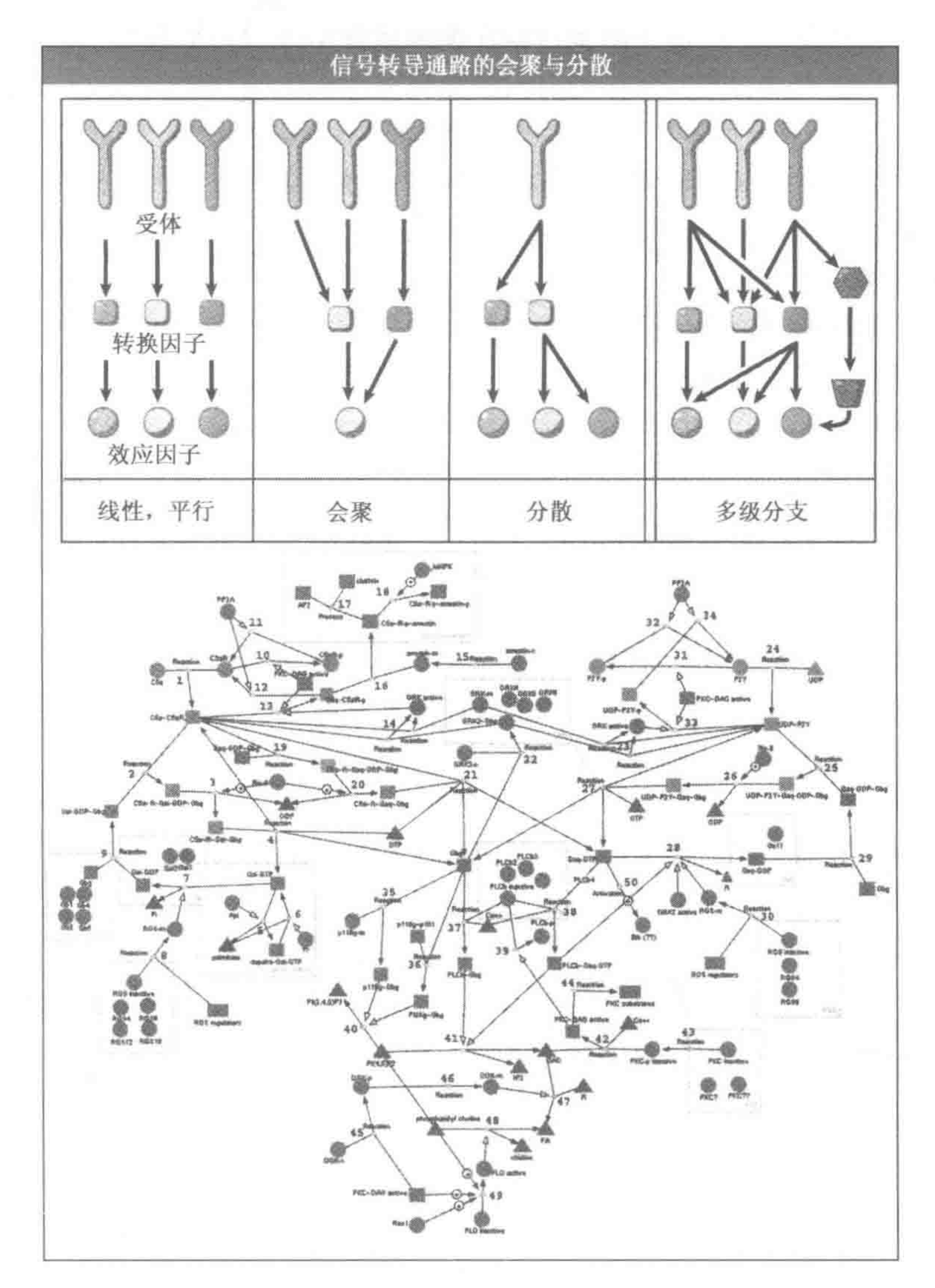


图 14.4　信号转导通路通过会聚和分散分支来协同信息流。最上面的图表显示简单的三个水平上的信号网络如何将信息分类。会聚或分散能够通过信号转导通路在多个点发生。作为一个复杂的例子，图形下面的部分显示的是小鼠巨噬细胞系中 G 蛋白介导的信号网络很小的一部分（～10%）。它省略了若干通路间调控机制并完全忽略了非 G 蛋白耦联受体的输入信号。此通路图由德州西南大学医学中心的 Lily Jiang 惠赠。

会聚分支——若干受体活化了相同的通路从而引起相同的调节反应——这也是很常见的。会聚分支使多种输入信号，无论是刺激性的还是抑制性的，都被整合并在受体下

游的一个共有位点被协同调控。在一个靶细胞中，针对若干不同激素的受体通常会启动相似或重叠的信号转导模式。

重叠模式和分散信号通路在细胞中形成了将反应和多种输入协同起来的信号网络（图 14.4）。通常，这样的通路在数目、成分多样性和其线路图的拓扑学方面都很复杂。信号转导网络在空间上也是很复杂的。它们可能包含多种亚细胞定位的组分，最初的受体及相关的蛋白在质膜上，而下游蛋白则在细胞质或细胞内的细胞器上。这种复杂性使细胞将进入信号整合并分类，从而同时调控多种细胞内功能。

如图 14.4 下半部分所示，信号转导网络的复杂性和适应性，使它们在整个细胞水平上的动力学上很难甚至不可能直观掌握。信号转导网络类似于大型模拟计算机，研究人员日益依靠计算工具来获知细胞信息流及其调控。首先，许多仅包含两种或三种蛋白质的信号相互作用在发挥功能上类似于传统计算的逻辑线路（见下一节）。这种电子学上的线路原理和经验也推动了生物学信号转导功能的研究。

细胞信号转导网络超乎寻常的复杂性可以被简单认为它们由相互作用的信号分子组成，即以很易理解的方式传递信号的蛋白质组合。细胞信号模块类似于电子仪器的一个整合线路，它执行已知的功能，但其实际的组件可以用另一个设备中相似用途的组件替换。模块构筑的概念推进了对信号转导网络在质和量上的理解。我们在本章后面将提到许多标准的信号模块。例子包括单体的和异源三聚体 G 蛋白模块、MAPK 级联、酪氨酸激酶受体及其结合蛋白和 Ca^{2+} 释放/摄取模块。在每种情况下，不管无数系统发生的、发育的和生理上的变异，了解这类模块的基本功能传达了所有的其具体化的理解。最后，模块进化的重要性是显著的；一旦一个模块的构造确定了，它可以被重新使用。

为了更大规模的网络，多种对活细胞更深入的检测方法已同强大的动力学建模策略相结合，从而在信号转导模块或者整个网络范围内促进了对信息流日益精确的定量分析。这些建立在可靠的和实验上的参数设定的模型能够表示系统中的信号转导过程，这一过程通过直觉或 ad hoc 分析真是太复杂了。它们是极其重要的可进行分析的测验，因为通过测验模型正确性的方法，它们能够预测实验结果。然后有充分根据的模型能够用来推测还不能进行数据设定的系统的机制。当复杂性更高时，计算机科学的原理和手段越来越多地用于细胞内信息流的系统分析。利用计算手段来分析大量定量数据，能使我们获知细胞的信息流及其调控。发展信号转导网络的定量模型是信号生物学中一项前沿工作。这些模型有助于网络功能的表述以及通过实验揭示机制。

14.7 细胞信号转导通路可被认为是一系列的生化反应

关键概念

- 信号转导网络由多组生化反应组成，如数学逻辑功能一样整合信息。
- 这种逻辑功能整合就是将信号转导网络整合起来在更复杂的水平上处理信息。

如前面所介绍，信号转导通路整合并将信息引到细胞靶标的过程与用于设计电子计算机单独线路的数学逻辑模型惊人地相似。事实上，计算机科学家和工程师在设计计算机和电子调控设备时考虑的所有功能组件本质上是有生物学价值的。为了理解信号转导通路，把通路中的反应组合看做是用于电子计算的组成性逻辑线路，如图 14.5 所示。

最简单的例子是当两条刺激通路会聚时。如果二者中任何一个输入充分足以引起应答，那么会聚将形成一个“或”（OR）的功能。如果二者自身的输入都不充足，但是二者的联合可以引起应答，那么会聚通路将形成“和”（AND）功能。“和”线路也被称为重合检测器——只有当两条刺激通路同时被活化时才会引起反应。

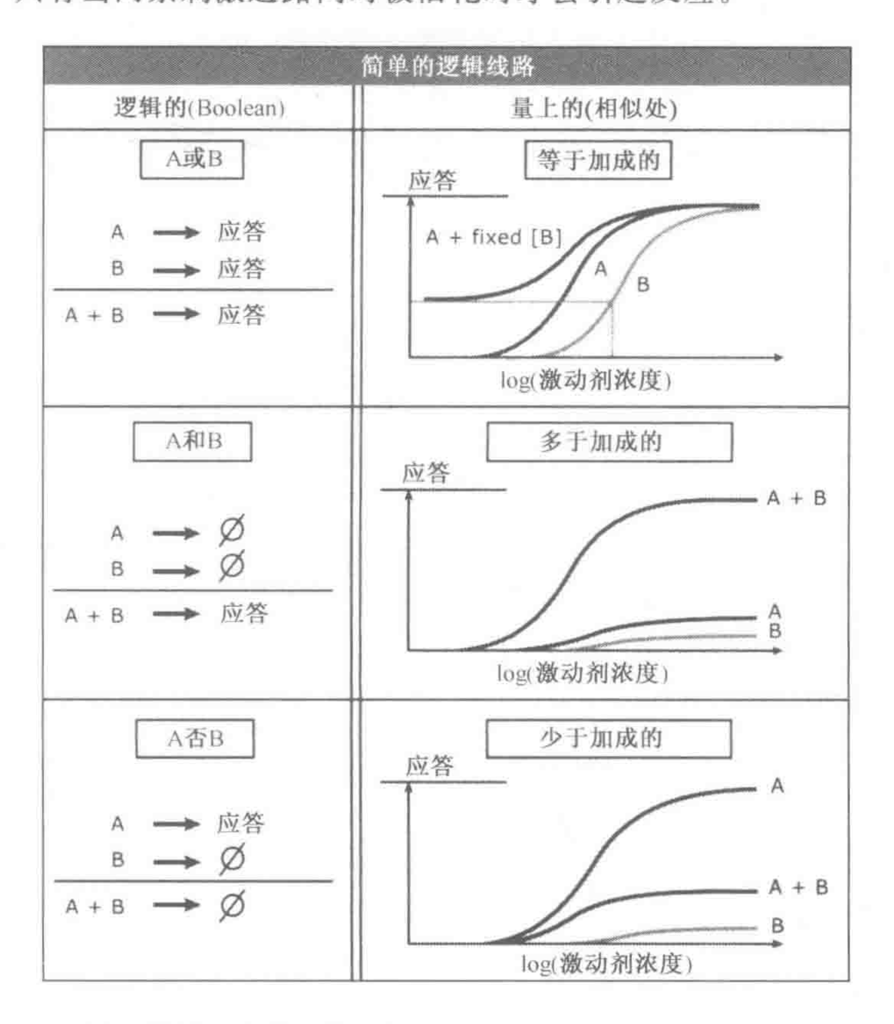


图 14.5　信号转导网络通过简单的逻辑功能来处理信息。Boolean OR，AND 和 NOT 功能（左）与如右边显示的会聚信号之间在量上的相互作用相对应。

两种相似但在量上不足的输入联合能够产生功能。作为选择，两种机制上不同的输入对启动反应可能都是必需的。后者的一个例子是，只有当磷酸化后才能被变构活化的靶蛋白，或者当被募集到一个特异的亚细胞定位时通过磷酸化被活化的靶蛋白。

同 AND 线路相反的是 NOT 功能，一条通路阻止了另一条的刺激作用。简单的逻辑通道可以在细胞信号通路的许多区域观察到。

我们也可以从量上思考会聚信号转导，而不是 Boolean 定义的把输入附加性当作一个不同的过程（图 14.5，右）。OR 功能指的是上面的可以被认为是两条通路的附加的正输入。这样的附加性能够表现出若干受体刺激一种特异的 G 蛋白库的能力，或者是两种蛋白激酶磷酸化一种单一的底物的能力。附加性也许是正的，如上面的例子所示，或者是负的，就像两种抑制输入联合时那样。抑制和刺激也可能附加性地联合来产生一个代数上的平衡输出。作为选择，多种输入能够和多于或者少于一个附加效果相联合。上面讨论的 NOT 功能类似于对刺激的一种阻止。AND 功能表达的是联合，其中一种

输入加强了其他信号的作用，但是单独时的作用却很小。

甚至是简单的信号转导网络也能够显示出信息处理的复杂模式。一个很好的例子是“记忆”的创造：使一个瞬时的信号作用或多或少地变得持久。信号转导通路具有多种使人记忆或遗忘的方法。在蛋白激酶通路中的一个常见的机制是正反馈环，如图14.6所示。在一个正反馈环中，输入信号刺激一个转导蛋白（T），然后它会刺激效应蛋白（E）来产生输出。如果效应蛋白也能够活化转导蛋白，足够的原始信号就能够反

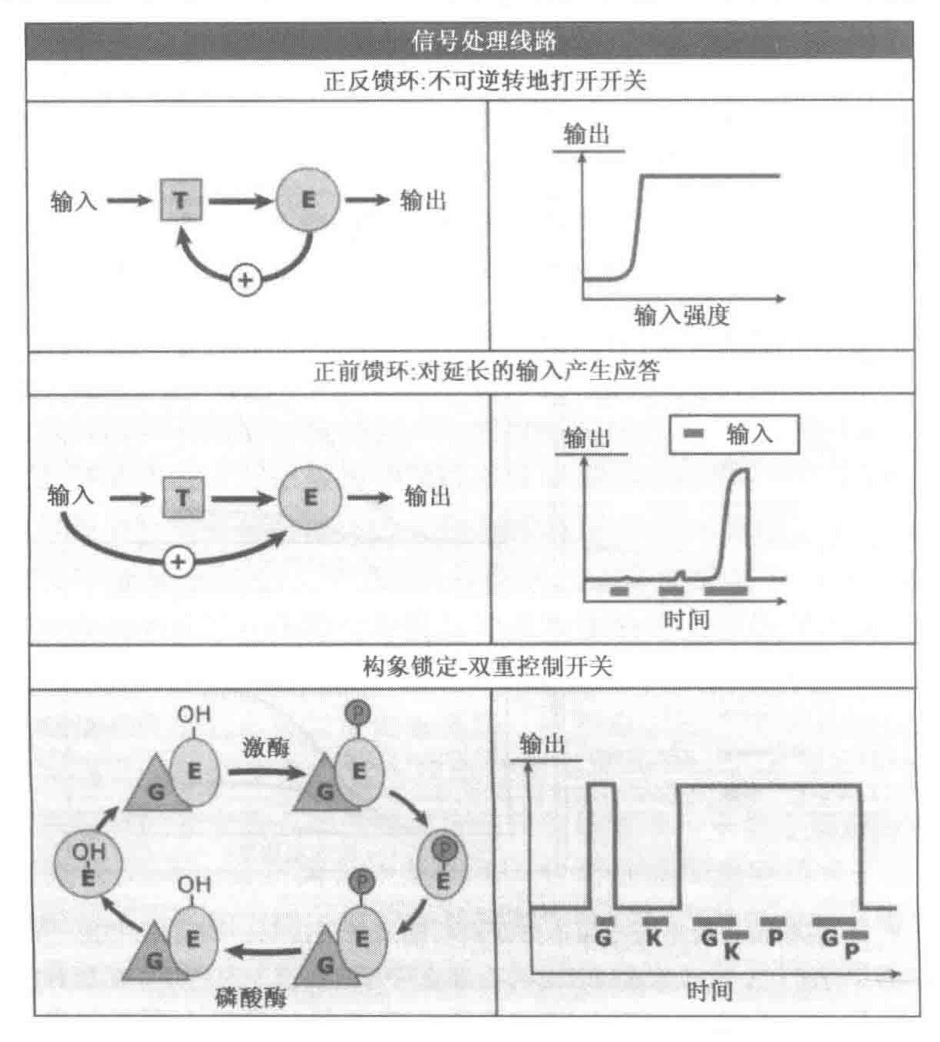


图 14.6　相对复杂的信号处理可以通过简单的多蛋白模块来完成。这张图描绘了三种类型的信号转导模块（左）和它们对激动剂的反应（右）。（上部）在一个正反馈模块中，一个转导子（T）刺激一个效应子（E）从而引起一个细胞输出，但是效应子也刺激转导子的活性。结果是一个全有或全无的开关，这里输入信号达到一个阈值只有很小的作用，但随后当来自效应子的反馈足以维持转导子活性时信息足以保证效应，即使缺少继续来自受体的信号输入。（中部）在一个正前馈模块中，效应子既需要来自转导子的信号，也需要来自通路上游的信号。当刺激很短暂时（右边短的水平棒），没有大量转导子的积累，输出的信号很小。当刺激延长时（较长的棒），信号输出变大。（底部）在一些双重调控开关模块中，一个调节子（G）的结合既能活化效应子，又能显露其他的调控位点，如这里显示蛋白激酶的一个丝氨酸底物位点（—OH）。只有当与G结合时，效应子才能被磷酸化或去磷酸化。因此，如右图所示，只加入G将活化激酶，但是只有激酶（K）将无活性。如果G结合使激酶活化，磷酸化对磷酸酶活性有抗性，除非G再次出现从而重新暴露磷酸-丝氨酸残基（如右图P显示）。

馈给转导蛋白，甚至是将输入移除时，都能维持效应蛋白大量的输出。这样的系统通常表现出一种阈值作用，如图 14.6 右边所示。

一个正反馈环能够产生另一种类型的记忆（图 14.6，中间），表明了输入的持续时间。在这样的线路中，效应蛋白需要受体和中间转导蛋白的同时输入。如果由受体经转导蛋白的通路相对较慢，或者如果它需要充足的转导蛋白的积累，只有延长的输入才能触发一个反应，如右边的基于时间的输出图。

第三种建立记忆的途径是，通过一次输入来控制次级调节性事件的可逆性（图 14.6，底部）。WASP 是一种起始肌动蛋白聚合从而促进细胞运动和形状改变的蛋白质，可以通过磷酸化或者与一种小 GTP 结合蛋白（G）Cdc42 的结合使其活化。尽管如此，WASP 上的磷酸化位点只有当 WASP 与 Cdc42 结合时才能暴露出来。因此磷酸化既需要活化的 Cdc42 也需要活化的蛋白激酶。如果 Cdc42 分离，那么只有当特性保持不确定，其他信号分子再次与其结合后，从而暴露其对蛋白磷酸酶的结合位点，WASP 的磷酸化状态才能维持。如基于时间的图所示，接触 Cdc42 则有活性，但只接触激酶则无活性。如果存在 Cdc42，那么激酶就能够活化 WASP。磷酸-WASP 对蛋白磷酸酶（P）相对不敏感，但是如果 Cdc42 或其他 G 蛋白结合从而暴露对磷酸酶的位点时，磷酸-WASP 能够去磷酸化。

14.8 支架结构增加了信号转导效率同时增强了信号转导的空间定位特异性

关键概念

- **支架结构将多种信号转导蛋白组合在一起，并通过将有不同配对因子的组成成员相隔离来形成通路特异性。**
- **支架结构增大了信号转导蛋白的局部浓度。**
- **支架结构定位信号转导通路的作用位点。**

一个信号转导通路中的蛋白质通常在细胞内是共定位的，这对它们彼此的相互作用是有利的，而且它们同其他蛋白质相互作用可能性减到最小。许多信号转导通路是由支架结构组织的。**支架**结构在一个含多种蛋白复合体信号转导通路中结合若干组分来增强信号转导的效率。支架结构能促进彼此亲和力很低的蛋白质间的相互作用，加速整合的复合体的活化（经常是钝化），并将信号转导蛋白定位到合适的作用位点。共定位可能是自主的或是受调控的，并且刺激依赖性支架结构经常确定信号转导的输出。

一个支架结构蛋白上的结合位点经常定位在不同模块的蛋白结合结构域，给我们的印象是蛋白只是被简单地设计用来将通路的组分组合在一起。许多支架结构蛋白缺乏固有的酶活性，但是一些信号转导酶同时具有支架结构的作用。

结合成支架结构通过增加组分的局部浓度从而促进信号转导，所以分子扩散或运输到它们的作用位点并不是必需的。在果蝇的光感受器细胞中，信号转导组分的支架结构对快速的信号转导是很关键的。这些细胞包含 InaD 支架蛋白，它有 5 个模块结合结构域，已知的如 PDZ 结构域。它的每个 PDZ 结构域都与其靶蛋白的 C 端基序结合，从而促进相关蛋白间的相互作用。图 14.7 显示的是 InaD 如何组织信号转导蛋白的一个模

型。缺失 InaD 的突变产生一种几乎是盲眼的果蝇，并且一个单一 PDZ 结构域的缺失会产生一种明显的视觉缺陷特征的蛋白，这一蛋白应该结合于缺失结构域上。

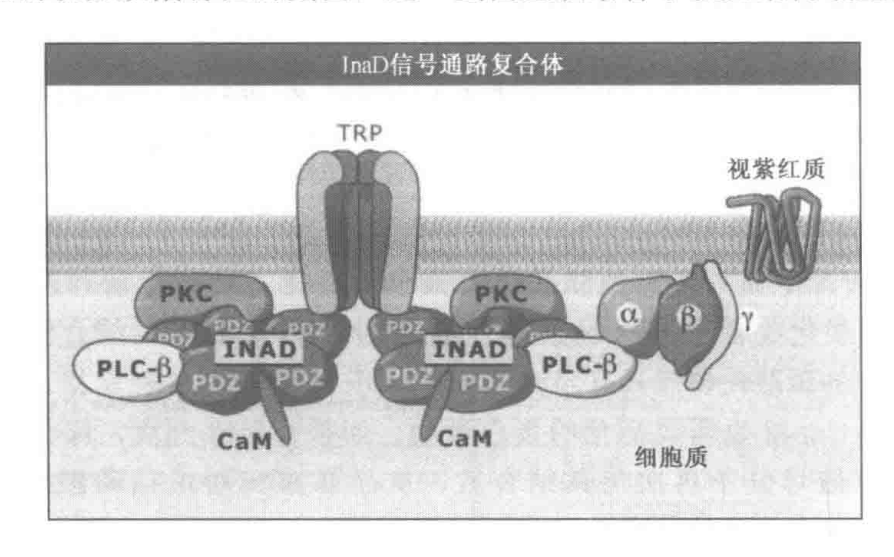


图 14.7 支架结构 InaD 组织果蝇光感受器细胞中传递视觉信号的蛋白。InaD 被定位在光感受器的膜上，并协调光感受和视觉转导。在无脊椎动物的眼睛中，视觉信号转导通路从视紫红质经过 Gq 到磷脂酶 C-β，而由 PLC 活化触发的 Ca^{2+} 释放会启动去极化。这个系统是特化的并且要保证其速度，因此需要相关蛋白靠得很近。InaD 包含 5 个 PDZ 结构域，每个 PDZ 结构域都与一个信号转导蛋白的 C 端结合。介导 Ca^{2+} 进入的 TRP 通道、PLC-β，以及参与快速脱敏的蛋白激酶 C 异构型都在构成上与 InaD 相结合。视紫红质和肌浆球蛋白（NinaC）也结合，而 G_q 则是间接结合。

另一个例子是 Ste5p，它是酿酒酵母中信息素诱导的交配应答途径的支架结构。图 14.8 说明了 Ste5p 是如何结合并组织促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）级联组分，包括一个 MAP3K（Ste11p）、一个 MAP2K（Ste7p）和一个 MAPK（Fus3p）（MAPK 级联将在 14.32 *MAPK 是许多信号通路的中枢*中讨论）。即使 Ste5p 结合激酶的位点的位置在蛋白线性序列上是变动的，它的功能仍被部分保留，这说明它的一个主要作用促使不同的酶接近，而不是将它们精确地定位。Ste5p 也同异源三聚体 G 蛋白的 β、γ 亚基相结合，它介导了交配信息素的功能，从而使膜信号同细胞内转导蛋白相联系。缺失 Ste5p 的酵母不能繁殖，证明了 Ste5p 对这种通过通路执行的生物学功能（并不是所有的功能）是必需的。

除了在自身通路中促进信号转导，支架结构还能够通过限制与其他信号转导蛋白的相互作用来增强信号的特异性。因此，支架结构使一个信号转导通路的组分与不适当的信号活化和错误的信号输出相隔绝。例如，酵母中繁殖和渗透传感（osmosensing）通路共用若干组分，包括 MAP3K Ste11p，但是每条通路都维持其特异性，因为其使用不同的约束信号转导的支架结构。

相反，过多支架结构存在时会抑制信号转导，因为单个的信号转导组分通常更多地会与不同的支架蛋白结合，而不是形成一个功能复合体。支架结构间的这种疏散引起了组分的分离，而不是浓缩，从而阻止了它们之间的相互作用。

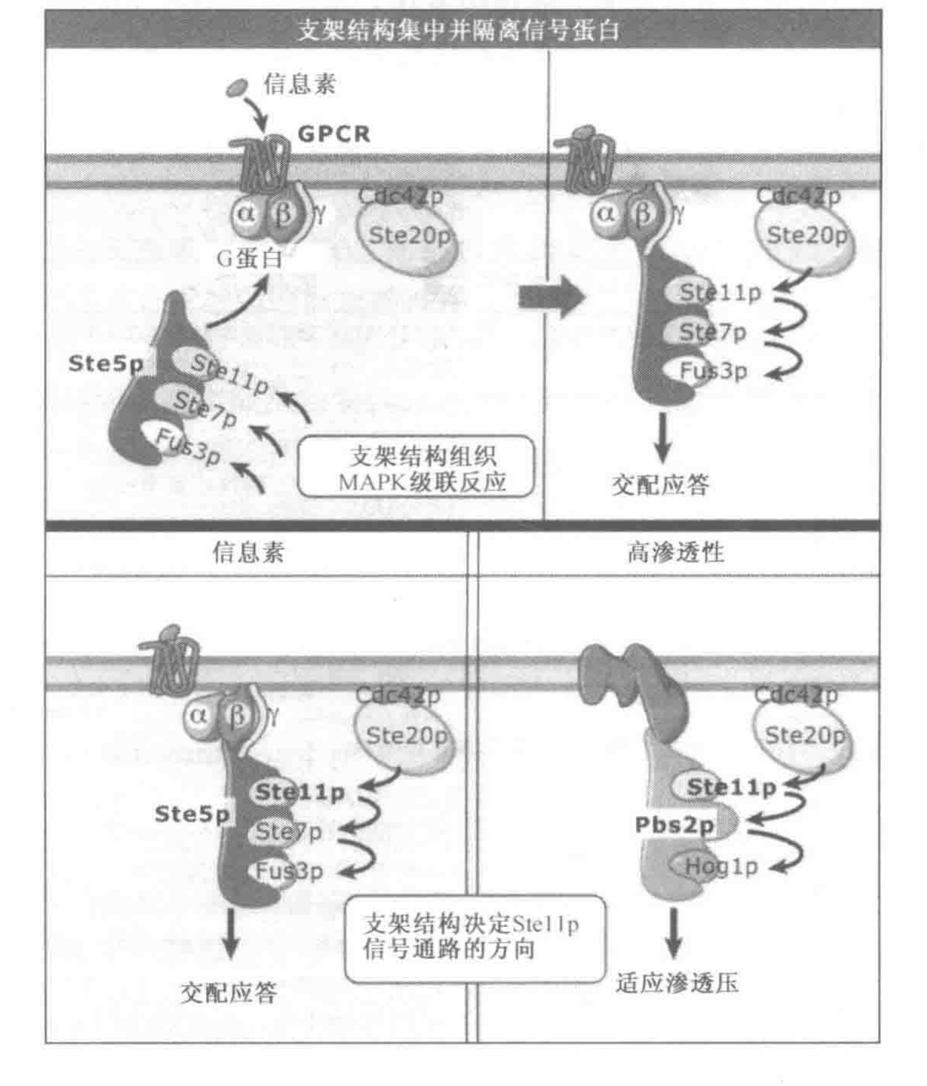


图 14.8　支架结构 Ste5p 组织参与 MAPK 级联反应的组分，在酿酒酵母中介导信息素诱导的交配应答。上图的左边，Ste5p 对信息素做出应答，将 MAPK 级联反应组分引导到膜。上图的右边，与异三聚体 G 蛋白结合将大体到位的 Ste5p 引导到蛋白激酶 Ste20p，此酶结合在激活的小 GTP 结合蛋白 Cdc42p 上。它们的共定位促进了随后级联反应各组分的活化，导致 MAPK Fus3p 的激活和交配应答。MAP3K Ste11p 不仅在交配通路中调节 MAPK Fus3p，还可在高渗透性（osmolarity）通路中调节 MAPK Hog1p，如下部图所示。Ste11p 结合点支架结构 Ste5p 或 Pbs2（支架结构和 MAP2K）决定哪种 MAPK 和下游事件作为输出信号被激活。

14.9　独立的模块结构域决定蛋白质-蛋白质相互作用

关键概念

- 蛋白质间的相互作用可能由其小的保守的结构域介导。
- 模块作用结构域是信号传输所必需的。
- 接头蛋白由结合域或基序单独组成。

模块蛋白相互作用结构域或基序存在于许多信号蛋白中，使其能够结合存在于蛋白

质、脂质、核酸等其他生物大分子上的结构基序，部分结构域见图 14.9。模块作用结构域并非像细胞骨架特异结合蛋白那样具有相当大的选择性，它们识别的不是单一靶分子，而是具有相似结构特点的靶分子群。

一些普通模块蛋白结构域的特征		
结构域	特征	涉及的细胞活动
14-3-3	结合蛋白的磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸	蛋白羁押
Bromo	结合乙酰化的赖氨酸残基	染色质伴随蛋白
CARD	二聚化	活化 Caspase
C1	结合佛波醇酯或甘油二酯	招募至膜上
C2	结合磷脂	信号转导，囊泡运输
EF hand	结合钙离子	依赖钙离子的过程
F-Box	结合泛素连接酶复合体上的 Skp1	泛素化
FHA	结合蛋白的磷酸苏氨酸或磷酸丝氨酸	多种应；DNA 损伤
FYVE	结合 PI（3）P	跨膜运输，TGF-β 信号通路
HECT	结合 E2 泛素接合酶以将泛素转移至底物或泛素链上	泛素化
LIM	结合锌的富半胱氨酸基序，形成两个衔接的重复锌指	多种过程
PDZ	结合到在末端具有一个疏水残基的蛋白质上，结合其 C 端 4-5 个残基；可能结合 PIP2	构架经常位于膜上的各类蛋白复合体
PH	结合专一的磷酸化肌糖，特别是 PI-4，5-P2，PI-3，4-P2 或 PI-3，4，5，P3	招募至膜上和自我运动
RING	结合锌离子，可能存在 E3 泛素连接酶上	泛素化，转录
SAM	同源或异源的低聚化	多种过程
SH2	结合蛋白的磷酸酪氨酸	酪氨酸蛋白激酶信号道路
SH3	结合 PXXP 基序	多种过程
TPR	使具有 WL/GYAFAP 残基的大约 34 个氨基酸序列变性；形成蛋白骨架	多种过程
WW	结合富含脯氨酸序列	对 SH3 具有替换作用；囊泡运输

图 14.9　此图描述的是在许多蛋白中发现的模块蛋白相互作用结构域的亚型。由这些结构域介导的相互作用对调控细胞功能是必需的。在原核细胞中即使存在这些结构域也是很少的。修改自 Mount Sinai 医院蛋白质相互作用结构域 Pawson 实验室（http：//pawsonlab.mshri.on.ca/）。

对于信号转导很重要的模块相互作用结构域，首先是在原癌基因 Src 编码的一种酪氨酸蛋白激酶中发现的，该酶有三个基本结构域，包括一个具有酪氨酸蛋白激酶活性的结构域，以及两个 Src 同源结构域，分别称为 SH2、SH3。**SH2、SH3 结构域**的鉴定最

初是通过 Src 与另外两种酪氨酸激酶 Fps、Abl 的比较得来，这两种结构域出现在多种蛋白质中，并精确参与蛋白质间的相互作用。

SH3 结构域由 50 个氨基酸残基组成，可与富含脯氨酸短序列特异性结合。许多胞质骨架蛋白以及在黏着斑中发现的蛋白均含有 SH3 结构域和富含脯氨酸序列，表明这种靶向基序会将含有这些结构域的蛋白送至细胞内相应的反应位点。与酪氨酸磷酸化 SH2 结合相反，富含脯氨酸结合位点的 SH3 结构域主要存在于休眠和激活的细胞中。但是，SH3 脯氨酸相互作用通过脯氨酸基序内的磷酸化而被负调。

SH2 结构域由约 100 个氨基酸残基组成，能结合在酪氨酸被磷酸化的蛋白质上，例如胞质酪氨酸激酶、酪氨酸激酶受体。因此，酪氨酸磷酸化调控 SH2 结合位点的构象，并由此调控一系列刺激依赖性的蛋白质相互作用。

一种巧妙的方法可以用来鉴定 SH2 结构域的结合特异性。将分离重组的 SH2 结构域在细胞裂解液中孵育，之后用纯化标签恢复该重组体。与 SH2 结构域相关的蛋白质都是一些能够被抗磷酸化酪氨酸抗体所识别的蛋白质。通过这种或其他方法，发现 SH2 结构域识别具有磷酸化酪氨酸位点的序列，酪氨酸的磷酸化提高 SH2 结构域的亲合力。

随着一个个相互作用被鉴定出来，能识别并结合模块结构域的特异氨基酸序列上的信息正不断积累。此外，利用 cDNA 和（或）肽链文库进行筛选去估计这些基序产生的结合能力。基于结合到排列序列上的序列特异性，每个结构域的靶序列被鉴定出来。随后这些靶序列能用来推断某结构域是否能结合到候选蛋白的位点上。

缺乏酶活性的**接头蛋白**连接信号转导分子并到达靶点，以此对外界信号产生应答。接头蛋白一般由两个或更多模块相互作用结构域或补充识别基序构成。与细胞骨架蛋白不同，接头蛋白具有多功能性，因为它的模块相互作用结构域和基序并非高度特异。接头蛋白通过蛋白质-蛋白质相互作用结构域连接两个或更多其他信号蛋白，从而共定位信号蛋白或者促进额外的相互作用。

Grb2 是一种典型的接头蛋白，因其可与 EGF 受体 C 端相结合而得以鉴定。Grb2 具有一个 SH2 结构域和两个 SH3 结构域。它通过 SH3 结构域结合到蛋白质富含脯氨酸的特异片段上，但这种结合可被负调控。Grb2 的一个靶蛋白是 SOS，属鸟苷酸交换因子，在应答 EGF 传递的信号时可激活小的 GTP 结合蛋白 Ras。Grb2 通过 SH2 结构域与酪氨酸磷酸化的蛋白质结合，其中包括刺激依赖型受体本身。因此，正是受体磷酸化酪氨酸残基与配体结合的性质使 Grb2 能与受体作用，在这一作用下，SOS 被轮流运送到膜结合受体处。一旦 SOS 到达胞膜处，便可激活其靶蛋白 Ras。

14.10　细胞信号具有显著适应性

关键概念

- 调节细胞信号转导通路的敏感性可使其对广泛的信号强度做出应答。
- 在所有细胞信号转导通路中这一功能由反馈调节机制完成。
- 大部分通路含有复杂的反馈调节回路从而应对不同时间与不同强度的信号。

细胞信号转导通路的一个普遍性质是对输入信号的适应。细胞不断调节对信号的敏

感性从而保持其探测输入信号变化的能力。如图 14.10 所示，当一个细胞接受一个新的外界信号时，便启动一个降低敏感性的过程来使细胞应答达到一个新的比原来峰值要低的水平。当该刺激解除，细胞的低敏感状态还会持续，其敏感性将缓慢恢复正常。与此相似，解除强刺激可使信号转导系统过敏感。

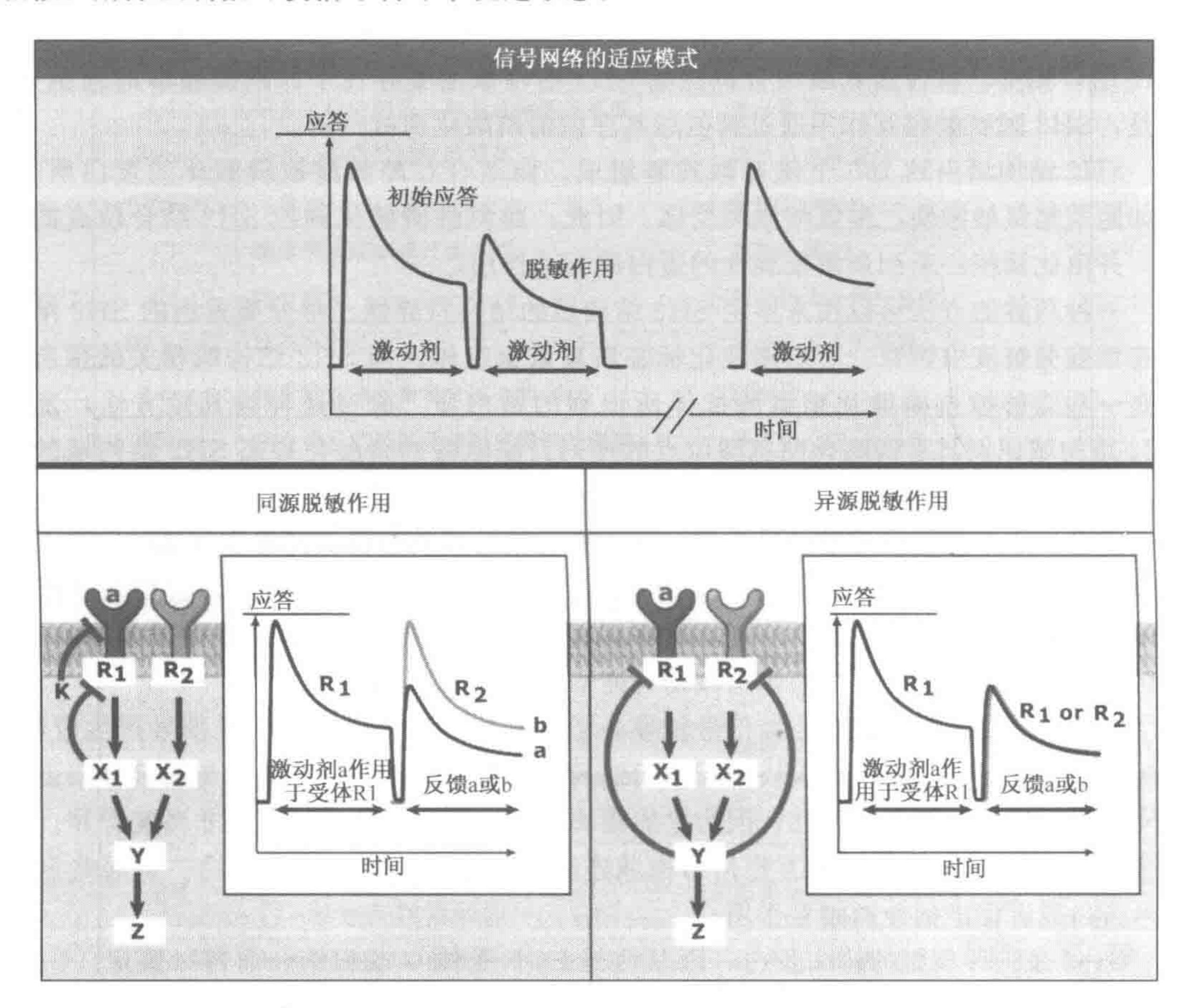


图 14.10　上图：接受刺激后，信号转导通路会调整它们的敏感性来适应新水平的输入信号。因此，在原始刺激后应答衰减。第二次相似的刺激将引起一个更小的反应，除非有足够的时间来恢复。下图：一些适应机制只在被刺激的受体上反馈，但不改变平行的通路。这样的机制具同源性。在左图，激动剂 a 作用于受体 R1 可启动仅仅使 R1 脱敏的两个反馈事件中的一个。在其他情况中，一个刺激也会引起平行或相关系统脱敏。在右图，激动剂 a 启动 R1 和 R2 的脱敏。对与 R2 结合的激动剂 b 的应答也是脱敏。这种异源的脱敏是普遍存在的。

细胞信号系统的适应性是生物动态平衡的一个最好的范例，而且能给人留下深刻印象。细胞通常在高于 100 倍范围内调节其对生理刺激的适应。哺乳动物的视觉反应可以适应超过 10^7 倍范围的光线。这种非凡的能力让感光受体细胞探测到单一的光子，从而使人无论在昏暗的光线条件下还是强烈的阳光下都能进行阅读活动。适应性在动物界、植物界、细菌界、真菌界都能观察到。尽管最复杂的适应机制在动物界发现，但是其多种特性在整个生物界都有体现。适应性的一般机制是负反馈回路，由此在生化水平上获取信号并控制适应过程。

适应性随着外来信号的强度和持续时间而变化。较强的、持续时间较长的信号趋于诱导较强的适应性变化，并且该适应性变化持续时间较长。细胞可以通过这种方式调节适应性，因为适应性是由一系列连续而又相对独立的机制驱动的，这些机制有各自的灵敏度和动力学参数。

G 蛋白通路为适应性提供了一个极好的例子。如图 14.11 所示，适应过程的第一步

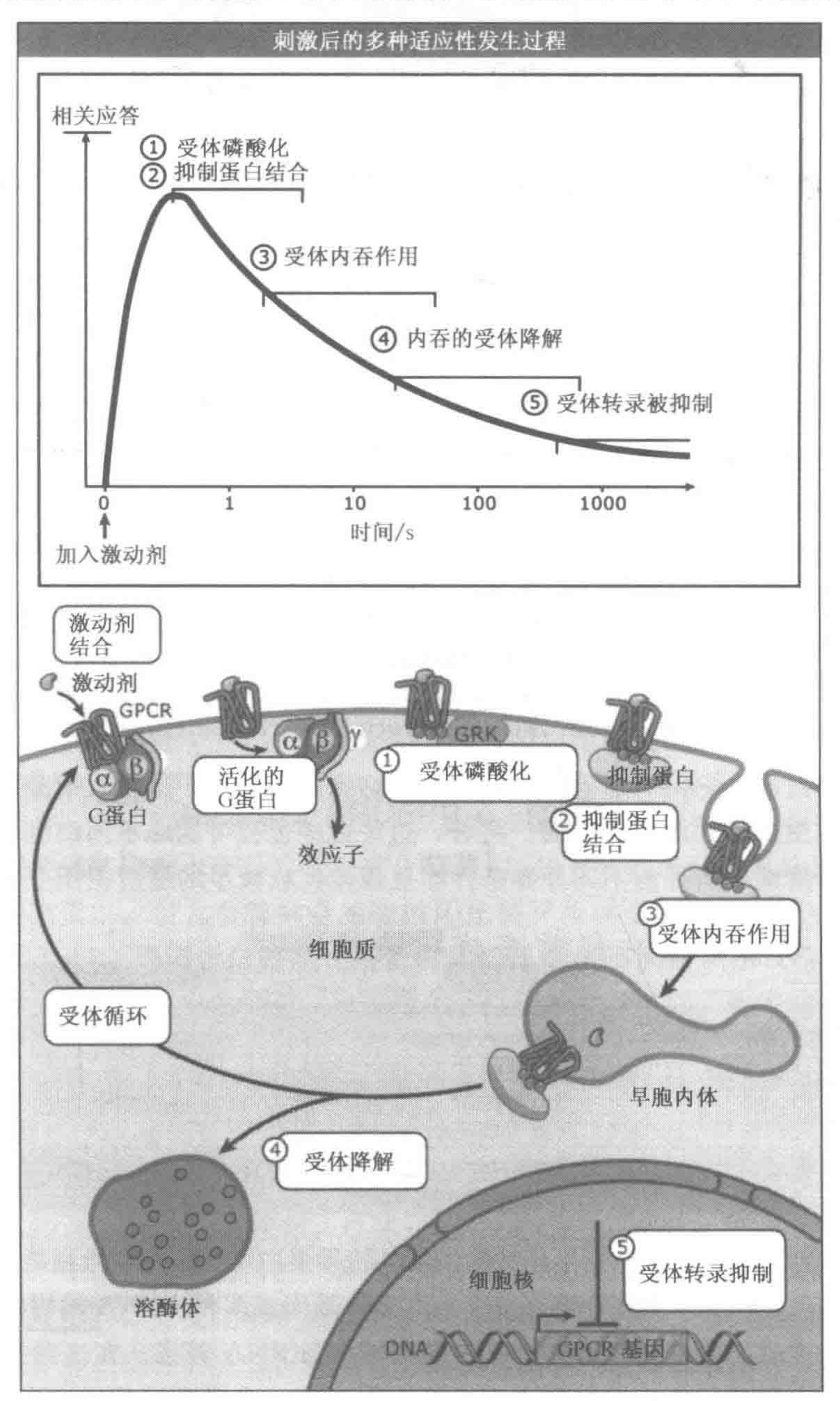


图 14.11 在一个刺激中，多种适应性过程被使用，适应的多种成套机制就是规则。它们通常根据刺激的持续时间和强度继而被使用。对于 GPCR，已知的脱敏机制至少有 5 种，同其他机制一起作用于 G 蛋白和效应子。

是由 GRK（G 蛋白耦联受体激酶）催化的受体磷酸化，GRK 可以选择性识别受体的配体激活构型。反过来，磷酸化又会抑制受体刺激 G 蛋白活化的能力，并且促进受体与视紫红质抑制蛋白（arrestin）结合，视紫红质抑制蛋白可以进一步抑制 G 蛋白活化。这种抑制蛋白的结合使受体参与细胞内吞作用。细胞内吞作用也可被视为受体降解的第一步。在这些直接效应产生的同时，许多受体基因显示出转录反馈抑制，这样，受体可以发出信号降低自身表达。

由此可见，刺激可以引起复杂多样的适应，从即时过程（磷酸化、视紫红质抑制蛋白结合）到延迟过程（转录调控），包括可逆和不可逆事件。这种多样的适应过程已经在多种 G 蛋白耦联受体通路中得到证实，许多细胞通过这种多样化适应过程控制受体传出信号。适应性的速度、范围和可逆性依赖于细胞的发育进程。

细胞可以在质量和数量上变换适应方式，这种变换是通过改变通路中的反馈起始点来完成的。在一个线性通路中，这些关键点将改变适应性的动力学性质和适应范围（见图 14.10）。在具有支路的通路中，改变这些关键点可以判断适应性是对单一信号输入做出的反应，还是由众多相似的信号输入所驱动。如果受体活化直接使其脱去敏感状态，或者在没有分支的通路上一个下游事件引发脱去敏感状态，那么只有启动该受体的信号发挥作用（见图 14.10）。受体选择的适应性称为**同源适应（homologous adaptation）**

反馈调控可选择地在会聚通路中启动多种受体的下游事件，从而同时可调节启动受体和其他受体。对一个确定的调控点来说这种**异源适应**调节所有可能的输入信号。一个普通的例子就是 G 蛋白耦联受体通过蛋白激酶 A 或蛋白激酶 C 磷酸化，这两种激酶分别被下游信号 cAMP 或 Ca^{2+} 加甘油三酯所激活。如同 GRK，这些激酶既可以削弱受体活性也可以促进视紫红质抑制蛋白结合。

细胞也通过改变它们对引入信号的应答来达到胞内平衡，这涉及细胞周期时相、新陈代谢状态或细胞活性的其他方面。再者，这些适应过程可能随不同细胞、不同细胞通路、细胞生命周期中所处的不同外界条件而呈现较大或较小的适应范围变化。

14.11 信号转导蛋白经常多样化表达

关键概念

- 类似信号转导蛋白的不同种类（亚型）可能扩展了信号通路调节机制。
- 亚型可能在功能上以及在对调节或表达的易感性方面有所不同。
- 细胞可能表达一个或多个亚型来满足它们信号转导的需要。

细胞通过表达多种具有独特生化特性的信号转导蛋白增强细胞信号通路的丰富度、适应性和调节性。这些多样的信号转导蛋白是由多种基因或多种 mRNA 编码的，mRNA 多样性可能源自通过选择性拼接得到的单一基因或者 mRNA 剪接。在这些选择中隐含的数学复杂性给人深刻印象。以神经递质 5-羟色胺为例：在哺乳动物中，有 13 种 5-羟色胺受体，每种受体刺激一种光谱型的 Gi、Gs、Gq 家族的 G 蛋白（第 14 号 5-羟色胺受体是一种离子通道）。图 14.12 显示了 5-羟色胺受体与 G 蛋白家族的关系。

G 蛋白和腺苷酰环化酶也具有很大的多样性。与 $G\alpha_i$ 相关的基因有三个，每一个都

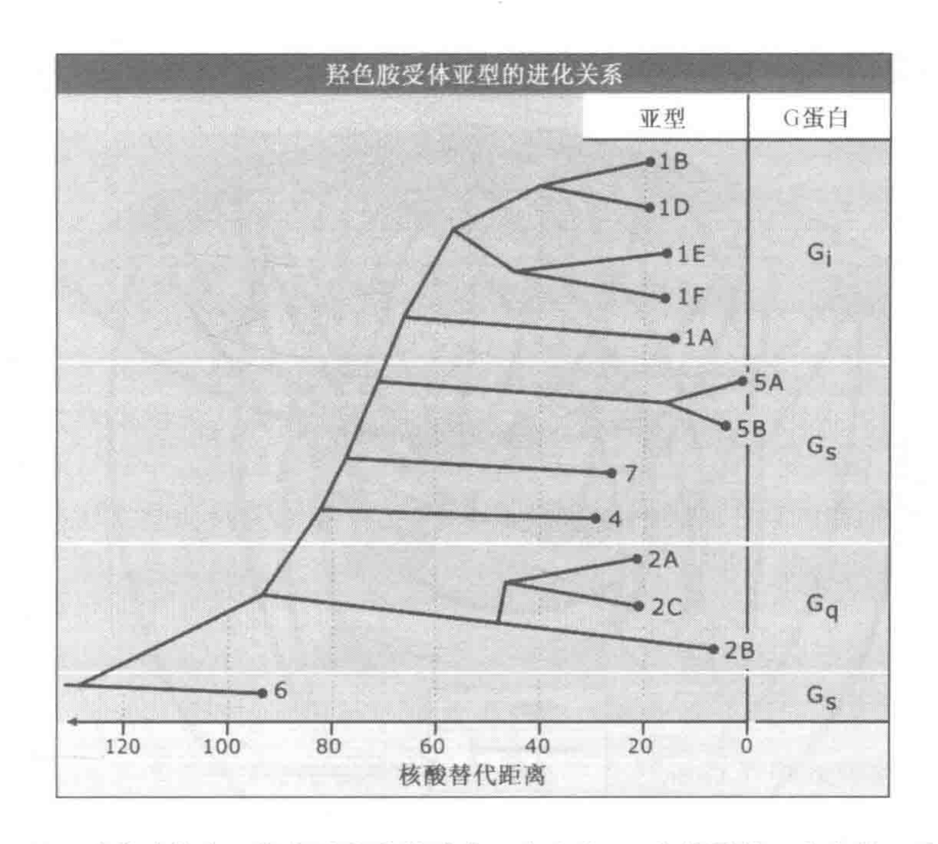


图 14.12 哺乳动物中 5-羟色胺的受体进化已产生含 13 个基因的一个家族，这些基因用于调控四类主要的 G 蛋白中的三类。虽然所有的受体都对天然配体 5-羟色胺应答，但是其结合位点在进化中出现许多不同，因此药物也逐步发展从而能够特异性地针对一个或更多亚型。第 3 类 5-羟色胺受体没有在这里显示，它是配体门离子通道，它与其他类型的相关性不明显。

与 $G\alpha_z$、$G\alpha_o$ 密切相关。此外，$G\alpha_o$ 的 mRNA 多样化拼接。Gq 家族成员有四个。与 Gα 相关基因有五个，与 Gβ 相关基因有十二个，大部分可能的 Gαβ 二聚体自然表达。与腺苷酰环化酶相关的基因有十个，腺苷酰环化酶是 Gs 的直接靶蛋白，也是其他 G 蛋白的直接或间接的靶蛋白。当九个膜结合腺苷酰环化酶异构体全部被 $G\alpha_s$ 活化之后，它们对 Gβγ、$G\alpha_i$、Ca^{2+}、钙调蛋白以及一些蛋白激酶显示出不同的刺激反应和抑制反应，如图 14.13 所示的例子。由此可见，由 5-羟色胺发出的刺激可以导致多种应答效应，这些效应依赖于蛋白在不同时间、不同定位条件下的不同形式。

有时一个信号转导蛋白的亚型遇到不同种类的信号输入。例如，磷脂酶 C 家族（PLC）的全部成员水解磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸从而形成两种第二信使，甘油二酯和肌醇-1，4，5-三磷酸（见 14.16 脂类和脂源性的化合物是信号分子）。不同的亚型可能受到 $G\alpha_{q'}$ 和 Gβγ 不同组合、磷酸化、单体 G 蛋白或 Ca^{2+} 的调节。

由于表达一个信号转导蛋白的一种形式时，一个细胞具有多种选择，所以它能够通过表达特殊的亚型，以此变化来完成其他相同的信号转导功能。不同的细胞表达一种或更多的亚型从而形成适合的应答，而且表达是随其他输入信号或细胞的新陈代谢情况而变化的。另外，信号转导通路对突变或其他损伤是有显著抗性的，因为一种信号种类或一种信号转导蛋白亚型的缺失通常都能够被其他种类表达增多或活性增强而补偿。与此相似，转入基因的过表达会导致内源蛋白表达减少。因此，多种受体种类的存在能够充分地增加适应性以及随之发生的信号转导网络对损伤的抗性。

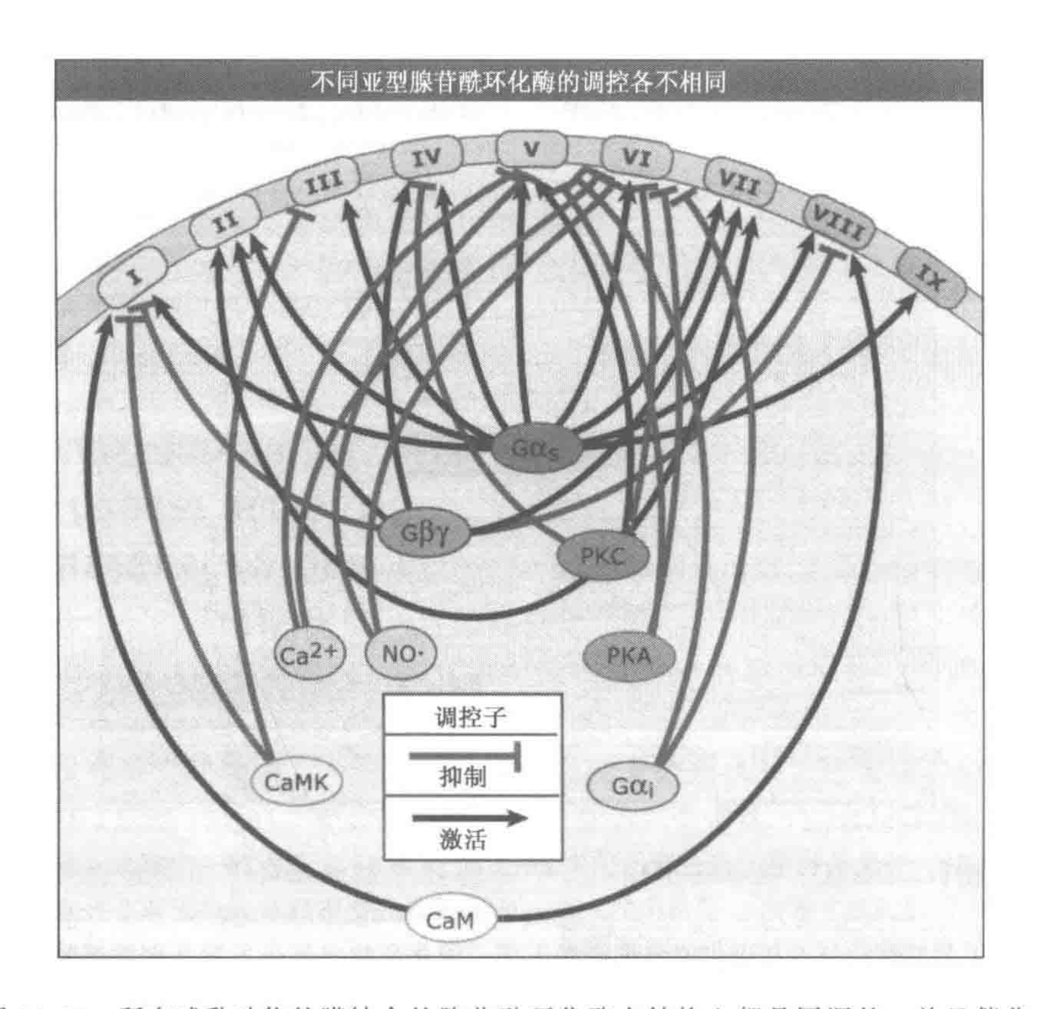


图 14.13　所有哺乳动物的膜结合的腺苷酰环化酶在结构上都是同源的，并且催化相同的反应，都被 $G\alpha_s$ 刺激。它们对其他输入（蛋白激酶 CaMK、PKA 和 PKC；Ca^{2+}；钙调蛋白（CaM）；NO·）的应答对每种亚型是特异的，从而为细胞内 cAMP 信号转导形成一个丰富组合的输入。修改自细胞信号联盟的 Paul Sternweis。

14.12　活化与钝化反应是分开的且受到独立调控

关键概念

- 活化与钝化反应通常由不同的调节蛋白完成。
- 活化与钝化反应相互分离使得调控在幅度和时间上更加精细。

在信号转导网络中，个别蛋白通常被不同的反应活化或钝化，这是便于其分别调控的一个特征。普通例子包括使用蛋白激酶和磷蛋白磷酸酶来催化蛋白的磷酸化和去磷酸化；使用腺苷酰环化酶来形成 cAMP，同时利用磷酸二酯酶水解它或阳离子转运蛋白将其泵出细胞；或者通过 GTP/GDP 转换因子（GEF）来活化 G 蛋白和 GTP 酶活化蛋白（GAP）来使其钝化。依靠化学计量学和详细的机制，当维持对一个信号转导通路活化和钝化的动力学调控时，这些方式能够传递累加的或非累加的输入信号。使用活化和钝化的不同反应类似于在可逆的新陈代谢通路中使用不同的合成代谢酶和分解代谢酶。

14.13 细胞信号系统使用变构效应和共价修饰

关键概念

- 共价效应涉及信号分子非共价结合时改变靶蛋白构型的能力。
- 蛋白质化学结构的共价修饰也常用于调节其活性。

细胞信号几乎运用了所有可能的机制来调节细胞内蛋白的活性，但更多时候机制与变构效应和共价修饰相关。通常单一信号蛋白特异性应答多种变构和共价信号输入。

变构效应涉及分子在与靶蛋白非共价结合时改变靶蛋白构象的能力。因为一种蛋白的活性反映其构型，任何同靶蛋白结合并改变其分子构象的分子均能改变靶蛋白的活性。任何分子均能产生变构效应：质子或钙离子、有机小分子，或者其他蛋白质。变构效应既能被抑制又能被激发。

蛋白质分子化学结构的共价修饰常用于调节其活性。蛋白质分子化学结构的改变涉及其构型改变，因此影响了它的活性。大多共价修饰调节是可逆的。最普遍的共价调节是磷酸化作用，磷酸基团从 ATP 转移到蛋白质的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基的羟基上。蛋白激酶催化蛋白质的磷酸化反应。该反应被磷酸化蛋白磷酸酯酶的作用拮抗，催化磷酸基团水解产生游离磷酸根离子，并且修饰未被修饰的羟基残基。

14.14 第二信使为信息转导提供了便捷的途径

关键概念

- 第二信使可以在距离较远的蛋白质之间传递信号。
- cAMP 和钙离子是被广泛使用的第二信使。

细胞转导信号通路根据蛋白质和小分子物质各自的特有属性对它们加以利用。小分子物质作为胞内信号分子或者**第二信使**比蛋白质作为信号转导因子更有优势。小分子物质可以被迅速合成及分解。由于它可以被迅速合成，因此可以在高浓度状态下发挥作用，以利于其降低对靶蛋白的亲合力。低亲合力允许迅速地分离，以至于它们的信号作用可以在游离第二信使被降解或抑制的时候被快速终止。因为第二信使很小，所以尽管许多细胞已经发展了抑制分子空间扩散的机制，但是第二信使仍然可以在细胞内快速扩散。因此，在快速应答过程中第二信使位于靶蛋白特别是远距离蛋白的上游。当信号必须同时定位于靶蛋白时，第二信使也很有用。第二信使的这些优势常常能弥补它们缺乏亲合力以及无力同时结合多种分子的缺陷。

图 14.14 列出了胞内第二信使通过进化的不断发展。其数量是很少的。其中一些是核苷，合成于主要代谢核苷前体。它们包括 cAMP、cGMP、ppGppp、环腺苷二磷酸核糖。其他可溶的第二信使包括 IP3、钙离子以及 NO 自由基。脂质第二信使包括 DAG、PIP2、鞘氨醇-1-磷酸、磷脂酸。

第一个被描述成为第二信使的细胞信号化合物是 cAMP。之所以称为第二信使，是因为 cAMP 在动物细胞信号转导通路中被合成并作为应答胞外众多激素的胞内第二信

第二信使				
第二信使	靶点	合成/释放	前体	移除
3′∶5′-环 AMP（cAMP）	蛋白激酶 A	腺苷酸环化酶	ATP	磷酸二酯酶
	细菌转录因子			有机阴离子转运子
	阳离子通道			
	环核酸磷酸二脂酶			
	Rap GDP/GTP 转换因子（Epac）			
魔点（ppGpp，ppGppp）	RNA 聚合酶	Rel1 A	GTP	SpoT-催化水解
	ObgE 转录停滞监测子	SpoT		
肌醇-1，3，5-三磷酸（IP_3）	IP3 开关的钙离子通道	磷酯酶 C	PIP_2	磷酯酶
二酯酰甘油（DAG）	蛋白激酶 C	磷酯酶 C	PIP_2	二酯酰甘油激酶
	Trp 阳离子通道			二酯酰甘油酯酶
磷脂酰-肌醇-4，5-二磷酸（PIP_2）	离子通道	PIP 5-激酶	PI-4-P	磷酯酶 C
	转运子			磷酸酶
3′∶5′-环 GMP（cGMP）	蛋白激酶 G	鸟苷酸环化酶	GTP	磷酸二酯酶
	阳离子通道			
	环核苷酸磷酸二酯酶			
环 ADP-核糖	钙离子通道	ADP-核糖环化酶	NAD	水解
环双鸟苷单磷酸	多样的双组分系统蛋白质	双鸟苷酸环化酶	GTP	环双鸟苷酸磷酸二酯酶
一氧化氮（NO˙）	鸟苷酸环化酶	NO˙合酶	精氨酸	减少
Ca^{2+}	众多的钙调素	从贮藏器官或质膜通道释放	储藏钙离子	再吸收和外排泵
磷脂酰-肌醇-3，4，5-三磷酸	Akt（蛋白激酶 B）	PI 3-激酶	PIP_2	磷酯酶
	其他 PH 结构域/蛋白质			

图 14.14　主要的第二信使，它们所调控的一些蛋白质，它们的来源和它们的分布。

号。在原核生物、真菌、动物细胞中，cAMP 将信息传达给多种调节蛋白。这一过程在高等植物中还没有被证实。

腺苷酸环化酶催化 ATP 生成 cAMP，这一过程被多种通路调节，这些通路依赖于它们发生的机体条件。在动物细胞中，腺苷酸环化酶是质膜上的一个完整蛋白，它的多种异构体被多种媒介物激发（见图 14.13）。例如 Gs，它最早是作为腺苷酸环化酶的调节者被发现的。真菌中的一些腺苷酸环化酶也是被 G 蛋白激发。细菌中的环化酶在其调节通路中的表现差别很大。

cAMP 离开细胞有两种途径。它可能通过由 ATP 驱动的阴离子通道被运出细胞，但更常见的一种方式是被环核苷酸磷酸二酯酶家族的蛋白水解成 5′-AMP，环核苷酸磷酸二酯酶家族的蛋白本身也受到多种控制调节。

动物细胞中 cAMP 典型的下游调节子是 cAMP 依赖的蛋白激酶。细菌中的 cAMP 调节的转录因子随后很快被发现，其他效应子目前已清楚（见图 14.14）。cAMP 系统保持着原初典型的真核信号转导通路，在这一通路中其成员涵盖几乎所有已知的信号转导分子及相互间的作用，即激素、受体、G 蛋白、腺苷酸环化酶、蛋白激酶、磷酸二酯酶、定位与活性变化。

接受第二信使刺激的蛋白激酶 PKA 是一个四聚体，由两个催化亚基（C 亚基）和两个调节亚基（R 亚基）组成（如图 14.15 所示）。R 亚基在底部结构域结合 C 亚基，使 C 亚基保持被遮蔽的状态。每个 R 亚基结合两分子的 cAMP，一个 PKA 全酶则结合四分子的 cAMP。当这些位点均被结合后，R 亚基二聚体就会迅速解离，暴露出两个高活性的自由 C 亚基。R 亚基对 C 亚基的亲合力在 cAMP 存在与不存在条件下相差约 10 000倍。如图 14.15 中的曲线所示，结合 cAMP 后，PKA 的活性曲线形成一个明显迅速上升的增势。这一活性增势对应的 cAMP 浓度范围相对狭小。PKA 活性也被磷酸化回路调节。磷酸化作用以及激活回路磷酸化为 R_2C_2 四聚体装配所必需。

PKA 大多存在于细胞质中，也可结合与细胞器相关联的骨架（A 激酶锚定蛋白或 AKAP）而定位于特定区域。这些 AKAP 促进膜蛋白磷酸化，包括 GPCR、转运载体、离子通道等。AKAP 也可通过与 PKA 结合定位于细胞其他特定位点，如线粒体、胞质骨架、中心体等。AKAP 时常受到调节分子如磷蛋白磷酸酶以及相应蛋白激酶等的作用而隐藏其结合位点，这使得多重信号转导通路相协调以及输出信号相整合。

通常情况下，PKA 使具有 Arg-Arg-Xaa-Ser-疏水基序的底物磷酸化，与底物作用的众多激酶在识别磷酸化位点之前先识别基本的氨基酸残基。PKA 在整个细胞中调节蛋白质，从离子通道到转录因子，其保守的底物特性常常能通过序列测定进行底物预测。cAMP 应答元件结合蛋白 CREB 在 PKA 介导下发生 Ser133 位点的磷酸化，而且它是 cAMP 影响多种基因转录的原因之一。

14.15　所有真核细胞中钙离子信号都具有多种作用

关键概念

- 钙离子本质上在所有细胞中都作为第二信使和调节分子。
- 钙离子直接作用于许多靶蛋白并且调节钙调蛋白的活性。
- 胞质钙离子浓度受细胞器储存与释放的调控。

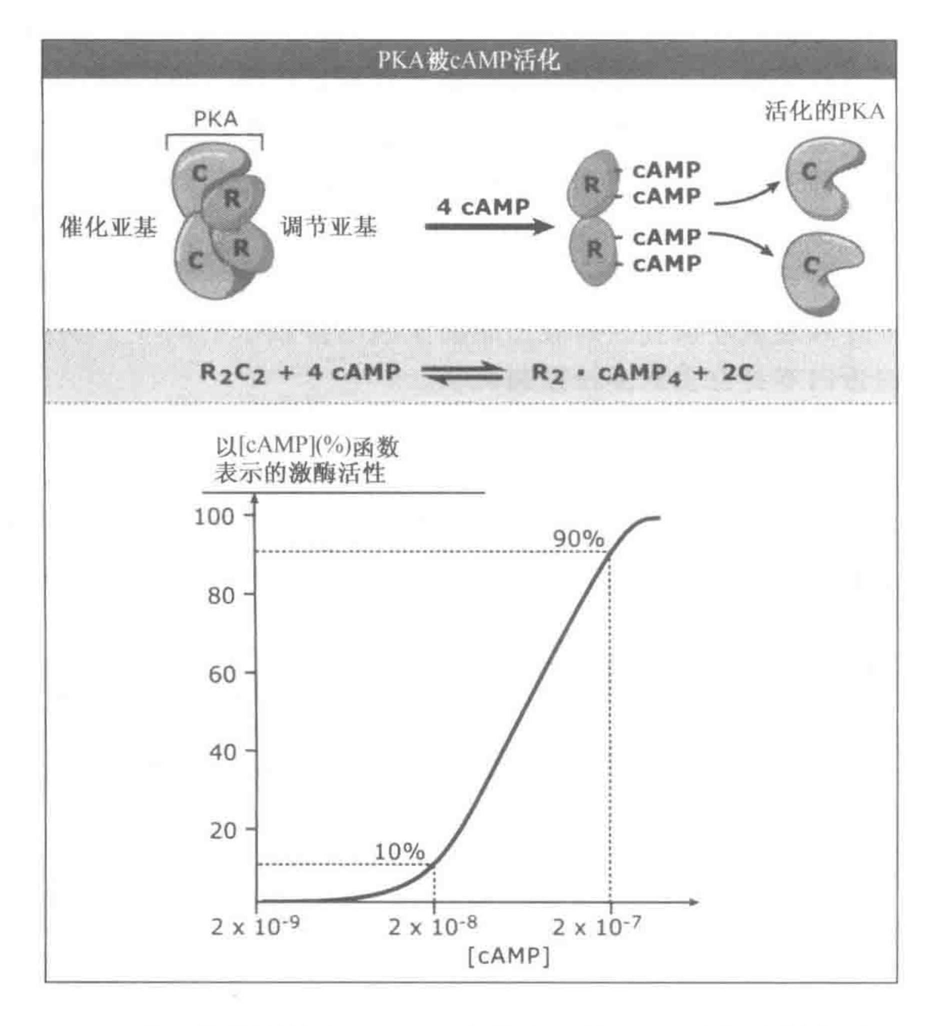


图 14.15 PKA 是一种异四聚体，它由两个催化亚基（C）和两个调节亚基（R）组成。四分子的 cAMP 与调节亚基结合后，会引起两个 C 的分离，PKA 的活性形式就从 cAMP 结合调节亚基二聚体的形成开始。下图，四分子 cAMP 的协同结合导致的一个活性急剧上升的图。cAMP 浓度增加 10 倍，活性近似地从 10%增加到 90%。这有一个明显的阈值，因为在 cAMP 浓度低时，活性几乎没有变化。

在所有细胞中，钙离子均作为第二信使，因此是一种比 cAMP 分布更广泛的第二信使。许多蛋白结合钙离子之后便会发生构象变化，这些变化体现在蛋白酶活性、亚细胞定位、蛋白质与其他蛋白质或脂类的作用上。钙离子调节的直接靶蛋白几乎包括本章中描述的所有蛋白质种类，如代谢蛋白、离子通道、离子泵、收缩蛋白。最典型的例子是肌肉中的肌动蛋白纤维被胞质钙离子触发的反应。

虽然在胞外液中的钙离子浓度是 1mmol/L，但是胞内钙离子浓度维持在 100nmol/L 水平，浓度的维持依靠离子泵蛋白和载体蛋白收放钙离子与内质网和线粒体。当内质网和质膜上的钙离子选择通道开放使得钙离子进入胞质时，钙离子信号则被激发。最重要的通道是存在于动物细胞质膜上的电压门控通道；内质网上的钙离子通道的开闭依赖于另外一个第二信使——1，4，5-三磷酸肌醇；肌肉组织中**肌浆网**上的电压门控通道的开启是对邻近质膜去极化的反应结果，这一过程即为兴奋收缩耦联过程。除了通过直接与钙离子结合受到调控的蛋白质之外，许多其他的蛋白质通过与一种广泛分布的钙离子传感器（一种大小约为 17kDa 的钙调蛋白）结合来对钙离子进行反馈。钙调蛋白需要结合四分子的钙离子来激发其活性，这种结合具有高度的协作性，并形成一个 s 型的活性

截面（如图 14.16 所示）。一般情况下，钙调蛋白用一种钙离子依赖的方式与其靶分子结合，但是在一些情况下未结合钙离子的钙调蛋白可以保持结合时候的状态，只是没有活性。例如，磷酸激酶的活化依赖于钙离子结合，而钙调蛋白即为磷酸激酶的一个结构亚组分。高等植物中这种机制有所不同，钙调蛋白不是作为一个独特的蛋白质被表达，而是作为钙离子依赖的调节蛋白质的一个结构域。致病菌百日咳杆菌（*Bordetella pertussis*）分泌的腺苷酸环化酶在胞外无活性，但在动物细胞中可以被未结合钙离子的钙调蛋白活化，动物细胞中 cAMP 非常快地产生具有很高的毒性。

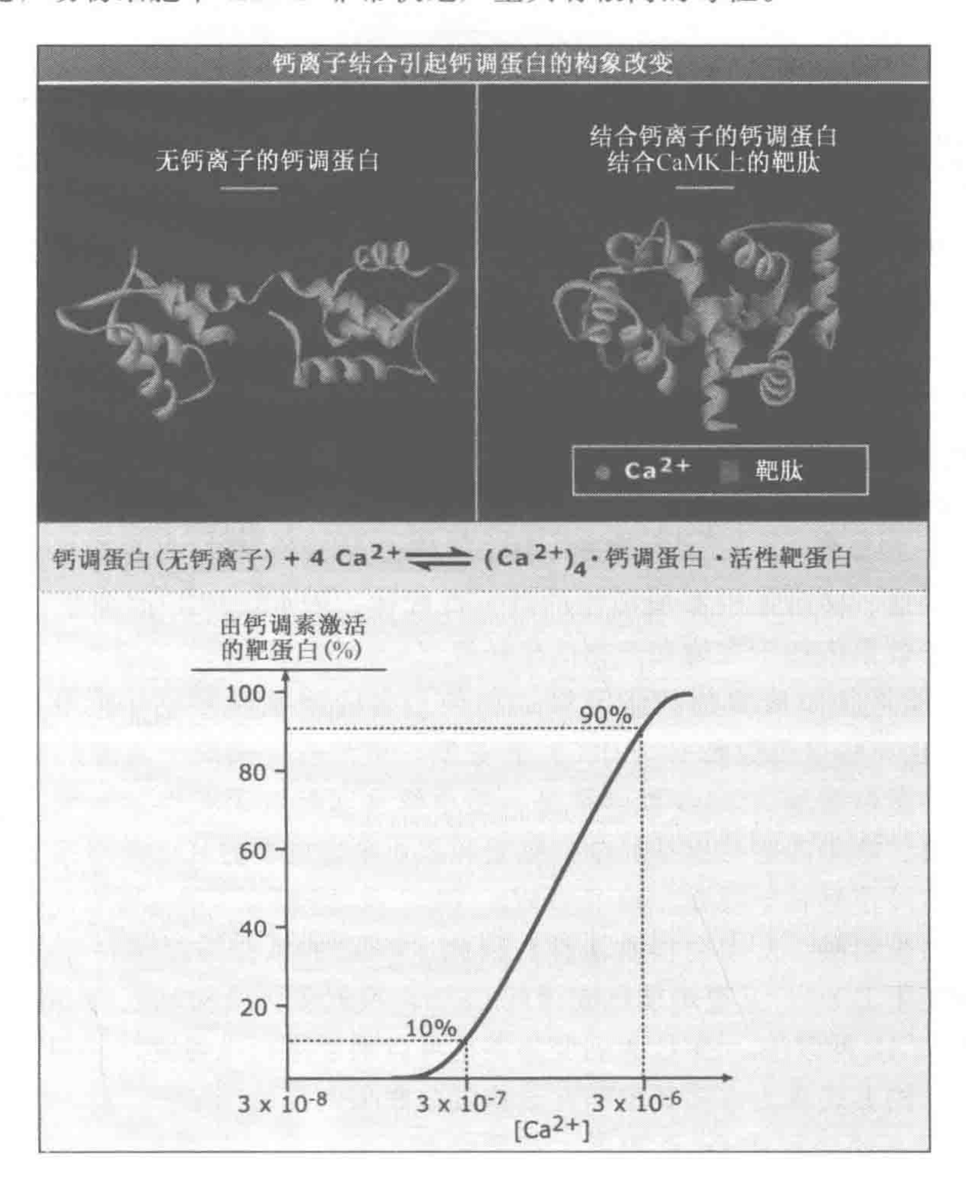


图 14.16 这张表示钙调蛋白释放 Ca^{2+} 和结合 4 个 Ca^{2+} 的晶体结构的带状结构图展现出钙调蛋白经历 Ca^{2+} 结合的巨大的构象变化。Ca^{2+}-钙调蛋白会引起靶蛋白活性的改变。下面的图表示的是通过钙调蛋白对靶蛋白的活化，钙调蛋白依据细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的功能发挥作用。结合 4 个 Ca^{2+} 来促使构象转变的必要条件会导致靶蛋白的协同活化。Ca^{2+} 浓度只增加 10 倍，活性就可以从 10%增至 90%。结构来自 Protein Data Bank files 1CFD 和 1MXE。

14.16 脂类和脂源性的化合物是信号分子

关键概念

- 多种脂源性第二信使在膜上生成。
- 磷脂酶 Cs 释放可溶性的脂类第二信使对不同的输入信号产生应答。
- 通道和转运蛋白受到不同的脂类和其他来源的输入信号的调节。
- PI 3 激酶可以合成 PIP_3 来调节细胞形态和运动性。
- PLD 和 PLA_2 可以形成其他的脂类第二信使。

在质膜上形成的信号可在胞质或细胞内的细胞器中有可溶性的调节靶点，但是完整的脂膜蛋白也会受到很强的调控。对于这些靶点来说，脂类第二信使可能是初级输入信号。来源于膜磷脂或其他种类的脂类在细胞信号转导中发挥着巨大的作用。因为对它们的分析比对可溶性信使更难，它们中有许多还有待于发现和研究。图 14.17 显示的是这些脂类中的一些的结构。

磷脂酶 Cs（PLC）是典型的脂类信号转导酶。PLC 亚型催化 3-sn-羟基和磷酸基团之间磷脂的水解，从而形成一个甘油二酯和磷酸酯。在动物和真菌中，对底物磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸（PIP_2）特异的 PLC 能够水解 PIP_2 形成两种第二信使：1，2-sn-甘油二酯（DAG）和肌醇-1，4，5-三磷酸（IP_3）。PLC 的底物 PIP_2 自身就是一种重要的调节若干离子通道、转运蛋白和酶活性的调节性配体。因此，PLC 改变三种第二信使的浓度；它的净效果依赖于底物和产物的净转换（net turnover）。

DAG 可能是已知最清楚的脂类第二信使；它的疏水性限制了它在膜上的作用。DAG 可以活化一些蛋白激酶 C（PKC）的亚型，调节若干阳离子通道的活性并至少能够活化另一种蛋白激酶。DAG 能够被进一步水解从而释放出花生四烯酸，它可以调节一些离子通道。花生四烯酸也是如前列腺素和凝血噁烷之类的氧化产物的前体，它们都是有效的细胞外信号转导媒介。除了 DAG，PKC 需要同 Ca^{2+} 和一种酸性的磷脂相互作用，如磷脂酰丝氨酸，从而变得有活性。因此，PKC 的活化需要多种输入信号同时发生，从而既产生 DAG，又要增加细胞内的 Ca^{2+}。根据催化结构域上高度保守的序列来分类，PKC 有 12 种以上。PKC 的三个亚类也可以通过序列来确定，共用不同的调控模式。它们的调控方式成为许多其他哺乳动物蛋白激酶调控的例子。

PKC 的第一个亚类在 DAG 出现之前通常是可溶性的或与膜松散相连。DAG 可引导它们同膜相连，并通过与其他调节物结合而活化。PKC 第二亚类的活化需要相似的脂类，但不需要 Ca^{2+}，第三亚类的活化需要的则是其他脂类，而不是 DAG 和 Ca^{2+}。

PKC 的 N 端区域包含一个假底物结构域，这是一种类似典型的底物序列的序列，序列中的丝氨酸被丙氨酸替换。这个假底物结构域能够结合到活性位点从而抑制激酶。活化剂可以引起假底物结构域翻转而离开活性位点。PKC 也能够通过蛋白水解活化，如许多带有分别存在的自身抑制性结构域的蛋白激酶。蛋白酶切开一个可变形的铰链区，导致调节结构域的丧失最终激活激酶。

PKC 是佛波酯的主要受体，佛波酯是一类较强的肿瘤促进物。佛波酯模仿 DAG，从而引起一个比生理刺激更强且时间更长的活化。这种强刺激会诱导 PKC 水解，结果

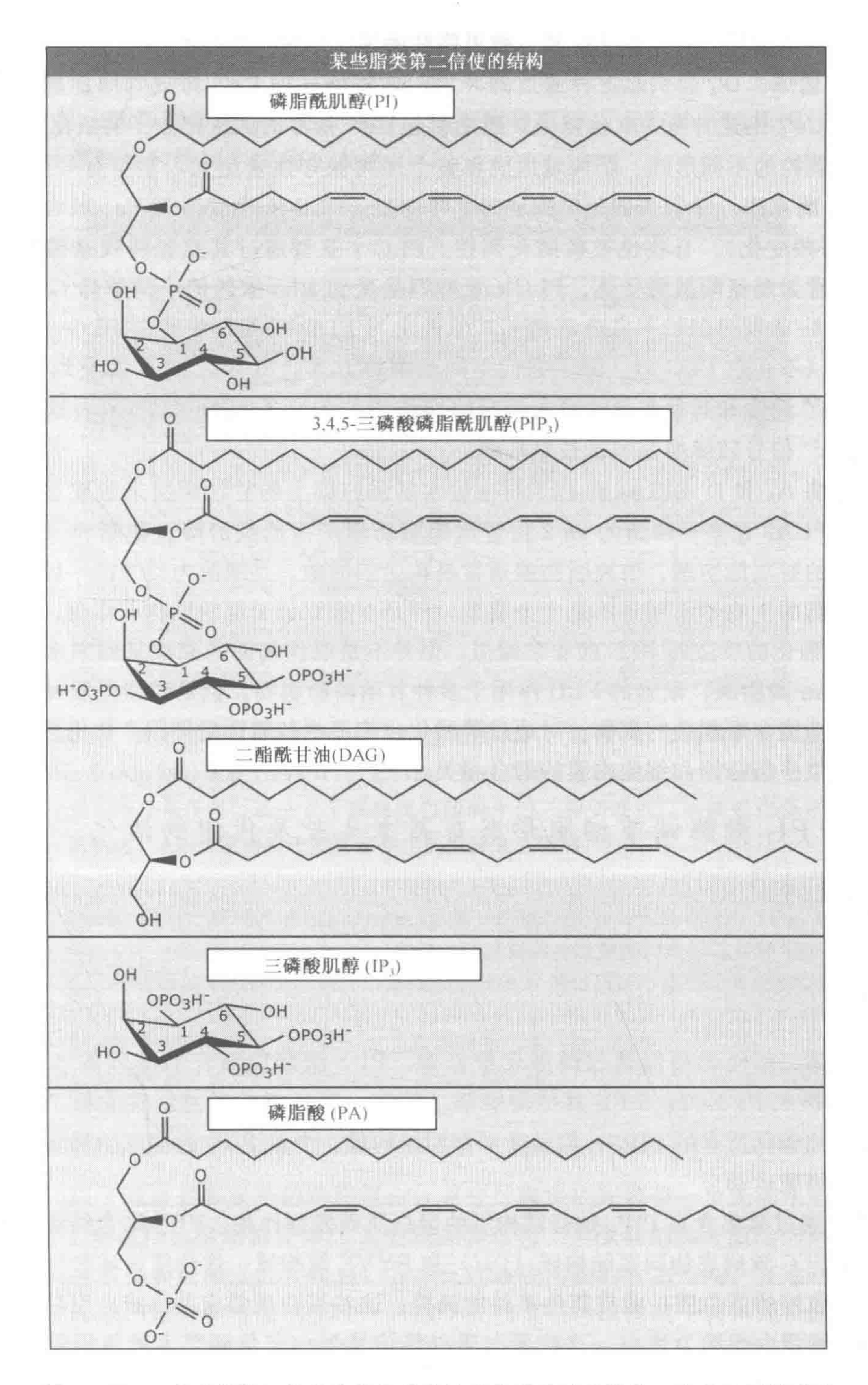


图 14.17　一些脂类第二信使和常见的前体磷脂酰肌醇的结构。这里显示的酰基侧链结构是哺乳动物 PI 脂类中最常见的。细胞中的大部分 PA 都是由磷脂酰肌醇获得的，而且它的酰基侧链可能不同于这里所显示的。

使激酶下调或丧失（蛋白激酶 C 发现的细节见EXP：14-0001）。

PLC 反应的第二种产物 IP_3 是一种可溶性的第二信使。最重要的 IP_3 靶标是内质网上的 Ca^{2+} 通道。IP_3 会引起这种通道的开启，并将储存的 Ca^{2+} 释放到细胞质中，因此会使胞质 Ca^{2+} 迅速升至 100 倍以上，随之引起 Ca^{2+} 信号的大量靶分子的活化。

根据调控的不同形式、结构域组成和整个序列保守性来定义，至少有 6 个 PIP_2 选择性 PLC 酶家族。它们的催化结构域都非常相似。PLC-βs 主要受到 $G\alpha_q$ 和 Gβγ 的刺激（个别的有些变化）。有些也被磷酸化调控。PLC-γ 亚型通过其酪氨酸残基磷酸化而被刺激，通常为酪氨酸激酶受体。PLC-ε 亚型则是受到 Rho 家族的小的单体 G 蛋白的调控。PLC-δs 的调控仍然不完全清楚。其他两个与 PLC-δs 相似的类型 PLC-η 和-ζ 最近已被阐释（不存在 PLC-α）。除了它们不同的调控方式，所有的 PLC 都受到 Ca^{2+} 的刺激，且 Ca^{2+} 经常和其他刺激性输入信号协同作用。在许多细胞中观察到，这种协同作用成为 Ca^{2+} 信号转导增强和延长的基础。

磷脂酶 A_2 和 D（PLA_2 和 PLD）也可水解细胞膜上的甘油磷脂来形成重要的信号化合物。PLA2 在多种磷脂的 sn-2 位置水解脂肪酸产生同类的溶血磷脂和一般是不饱和化合物的游离脂肪酸。游离脂肪酸通常是花生四烯酸，是细胞内信号的一种前体。游离溶血磷脂的生物学作用还不是十分清楚，但是对膜双分子层的结构有作用。

PLD 催化的反应同 PLC 的非常相似，但并不是取代侧面的磷酸基团来水解磷酸二酯形成 3-sn-磷脂酸。细胞的 PLD 作用于多种甘油磷脂底物，但是磷脂酰胆碱可能是同信号转导功能非常相关的底物。对通过磷酸化也能形成的磷脂酸作用产物仍然了解得很少，但是似乎与分泌和细胞内膜的融合相关。

14.17　PI_3 激酶调节细胞形态与基本生长及代谢的活化

关键概念

- 一些脂类第二信使的磷酸化会改变它们的活性。
- PIP_3 被带有一个血小板白细胞 C 激酶底物同系结构域的蛋白质所识别。

脂类第二信使也可能通过磷酸化被修饰。PI 3 激酶能够在肌醇环的 3-位磷酸化 PIP_2 从而形成 PI 3，4，5-PI_3，其他脂类第二信使。PI 3 激酶的总活性太低了，以至于不能有效地催化所有的 PIP_2，但是在局部膜结构域，少量 PIP_3 的形成能明显改变细胞的形态和细胞运动。

PIP_3 通过募集含有 PIP_3 结合结构域的蛋白质而发挥作用，PIP_3 结合结构域包括血小板白细胞 C 激酶底物同系结构域（PH）和 FYVE 结构域，这些结构域参与细胞骨架重建、可收缩的蛋白质功能或其他事件的调控。这些蛋白质锚定并（或）引导参与细胞运动的结构蛋白或动力蛋白，这些蛋白质也将信号蛋白定位到膜上的作用位点。PIP_3 信号转导非常迅速且显著；它在很大程度上解释了控制运动的哺乳动物细胞的流动性。

脂类介质在胰岛素信号转导通路中非常重要。胰岛素的结合刺激其受体的酪氨酸自磷酸化，并通过胰岛素受体底物（IRS）蛋白使效应子活化（见 14.30 酪氨酸蛋白激酶调控多种信号转导机制）。当 PI3 激酶的 p85 亚基同 IRS1 结合后，PI 3 激酶就被活化。由 PI 3 激酶产生的 PIP_3 通过它们的 PH 结构域来结合蛋白激酶 Akt 和磷酸肌醇依赖激

酶-1（PDK-1）。这种相互作用使 Akt 定位于膜上，并且被 PDK-1 活化，如图 14.18。Akt 可磷酸化下游的靶分子，包括蛋白激酶、GAP 和转录因子。Akt 的活化，特别是 Akt-2，对显示胰岛素作用特点是必需的，包括葡萄糖转运蛋白转录的调控、增强蛋白质合成以及糖异生和脂肪生成酶的表达。

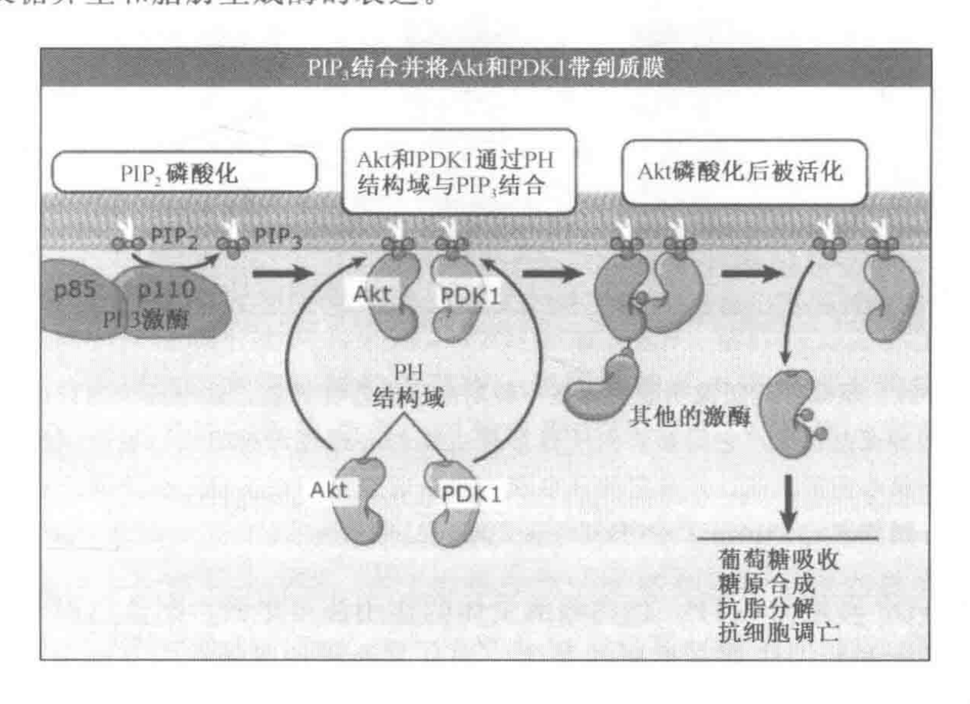


图 14.18 活化的 PI 3 激酶磷酸化 PIP_2 来形成 PIP_3。包含 PH 结构域的蛋白激酶 PDK1 和 Akt 结合质膜上的 PIP_3。它们的共定位促进了 PDK1 对 Akt 的磷酸化。在一个疏水基序范围内，通过若干候选蛋白激酶中的一种实现的二次磷酸化会导致 Akt 的活化。Akt-2 亚型对于胰岛素作用的发挥是必需的。

14.18 通过离子通道受体的信号转导非常迅速

关键概念

- 离子通道使离子经过孔道通过膜，并导致膜电位迅速（μs）的变化。
- 通道对特殊的离子或对阳离子或阴离子是有选择性的。
- 通道调控细胞内有调节作用的离子浓度，如 Ca^{2+}。

配体门离子通道是多亚基的跨膜蛋白，它穿过膜形成并调节一个充满水的孔道，图 14.19 显示了烟碱性乙酰胆碱受体的 X 射线晶体结构。当受到细胞外激动剂刺激后，亚基会发生构象重排和定向来打开孔道，并因此连通膜两侧的含水空间。在通过离子泵和转运蛋白而形成的电化学梯度的推动下，这个孔的直径可以使离子自由地从膜的一侧扩散到膜的另一侧（关于通道、泵和转运蛋白的机制，见第 2 章离子和小分子的跨膜转运）。通道通过精确地调控孔的直径和由合适的亲水性残基组成的壁对离子维持着选择性。这样，受体离子通道能够为阳离子或阴离子或选择的不同离子提供一条扩散途径。

在生物中，配体门离子通道提供了最快的信号转导方式。在结合一个激动剂配体的基础上，通道会在微秒内打开。在突触间，神经递质需要扩散不到 0.1μm 的距离，后突触细胞中的一个信号能够在 100μs 内产生。相反，受体刺激的 G 蛋白需要约 100ms

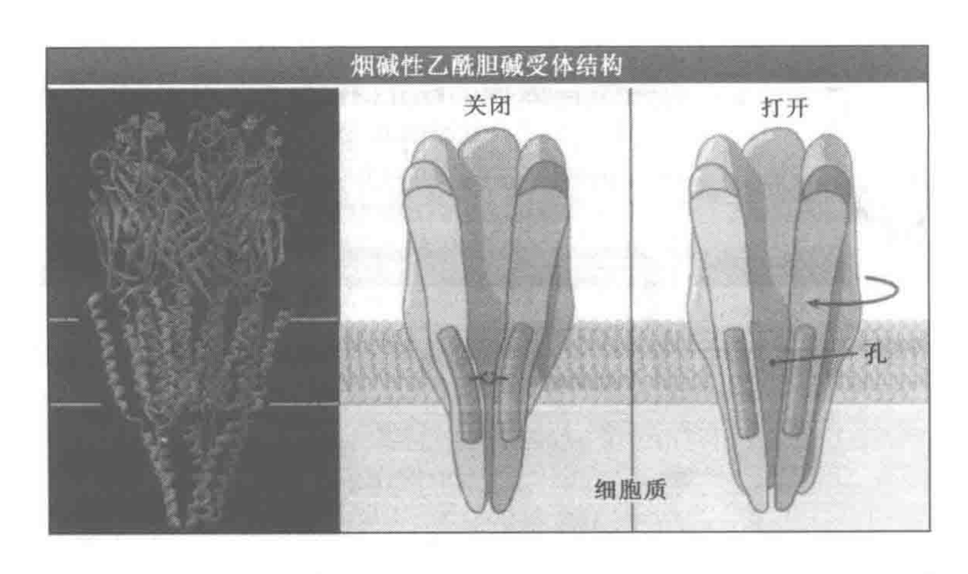


图 14.19 烟碱性类胆碱功能受体是一种阳离子选择性通道，它由五个同源但通常不相同的亚基组成，它们寡聚化从而形成主要的 α-螺旋跨膜核心。通道本身就是在这个核心内形成的，并且它的开启和关闭是通过亚基在排布上的协同变化来实现的。结构来自 Protein Data Bank file 2BG9。

来将结合的 GDP 转换为 GTP，蛋白激酶受体的作用甚至更慢。配体门离子通道在许多细胞以及神经元和肌肉中都是重要的受体，并且其他离子通道在由其他类配体触发的信号转导通路中同样发挥着必不可少的作用。

离子通道信号转导同本章中提到的其他受体的信号转导不同，它们没有直接的靶蛋白，通常也没有特异的第二信使参与。在大多数情况下，通道介导的离子流的作用是增大或减小细胞膜电位，因此调节代谢或电势驱动的离子的所有转运过程。

动物细胞通过泵出 Na^+ 并泵进 K^+ 来维持一个膜内为负的膜电位（膜电位的细节见 2.4 跨细胞膜的电化学梯度产生膜电位）。对 Na^+ 有选择性的通道打开将会使细胞去极化，而对 K^+ 有选择性的通道打开将使细胞超极化。与此相似，由于 Cl^- 主要在细胞外，Cl^- 通道的开启也将会引起超极化。这些电效应会有效地将信息传达给同膜电势耦联或与特殊的离子梯度耦联的效应子蛋白，或者是效应蛋白结合一种随着通道的打开其浓度会发生变化的特定离子（如 Ca^{2+}）。

烟碱性乙酰胆碱受体是典型的离子通道受体，是显示出具有通道作用的第一种受体。它是一种相对无选择性的阳离子通道，它会使 Na^+ 流入而引起靶细胞的去极化。现已清楚地知道，它是神经肌肉突触上的兴奋性受体，接受神经信号使肌肉收缩，但是选择性的亚型也能在神经元与许多其他细胞间活化。在肌肉中，烟碱性去极化是通过一个电压敏感的 Ca^{2+} 通道，使 Ca^{2+} 从肌浆网释放到胞质中而发挥作用。钙作为一种引发收缩的第二信使而发挥作用（见 2.13 兴奋-收缩耦联激活心肌和骨骼肌）。烟碱性受体通过相似的机制促使一些分泌细胞向胞外分泌，其中包括 Ca^{2+} 引起了胞外分泌。在烟碱性刺激能够引起一个**动作电位**（迅速沿着神经元传播的去极化）的神经元中，初始的去极化是由电压敏感的 Na^+ 通道感应到的。它们的开启（和其他通道的作用一起）会沿着神经元传播动作电位。

神经系统具有丰富的对其他神经递质应答的阳离子通道受体，其中最常见的是谷氨酸（Glu）。谷氨酸受体的三个不同的家族都具有阳离子传导的性质，但是每个家族都

有自身的药物反应谱。所有的都作为神经元的活化剂起作用，具有一个有趣的螺旋：NMDA 受体家族是由于其对一种选择性药物的应答而命名的，可允许 Ca^{2+} 和 Na^{+} 穿过。其活性的一个重要部分是允许向胞内的 Ca^{2+} 流，Ca^{2+} 是作用于各种靶标上的第二信使。在受伤或药物处理后谷氨酸释放而形成对 NMDA 通道的持久刺激，会引起大量 Ca^{2+} 进入，这对神经元是有毒的并能导致死亡。

受体通道的另一个功能群是通过允许向胞内的 Cl^{-} 流从而对阴离子具有选择性，并且能够超极化靶细胞。阴离子选择性受体包括那些针对 γ-氨基丁酸（GABA）和氨基乙酸（Gly）的受体。在神经元中，超极化能够抑制一个动作电位的起始和（或）神经递质的释放。

也许最不同的配体门通道家族是 TRP 和 TRP 样家族，已在哺乳动物中发现有 30 个。在无脊椎动物中发现有不同的形式。TRP 通道是 Ca^{2+} 选择性通道，是由同样亚基形成的围绕中心通道的四聚体。每种亚基由一组同源的 6 个跨膜螺旋组成，但是 N 端和 C 端包含不同的调节性结构域和蛋白质相互作用结构域，包括蛋白激酶结构域（其底物到目前还未知）。

所有的 TRP 通道允许 Ca^{2+} 的跨膜转运，使其作为第二信使发挥作用，但是不同的 TRP 亚型具有许多生理上的功能。在无脊椎动物的光感受器中发现的典型的 TRP，能使 Ca^{2+} 从细胞内储存库流进胞质从而起始视觉信号转导。其他的 TRP 则允许 Ca^{2+} 从细胞外进入细胞，甚至有些 TRP 直接允许 Ca^{2+} 从细胞外进入内质网，因为它们在质膜和内质网膜之间连接点上的通道间形成了一个桥梁。

TRP 通道的调控也许更不同。各种 TRP 通道应答于热、冷、痛刺激、压力和高或低摩尔渗透压浓度。许多 TRP 都受到如类二十烷酸、甘油二酯和 PIP_2 之类的脂类的正向或负面的调控。例如辣椒素是红辣椒中的辣味化合物，它是针对一些香草素受体（TRPV）的激动剂。其他 TRP 通道仍然是机械感受器，它能够使纤毛感受流体流动。这当中大家最熟悉的是内耳毛细胞的感受通道。当毛细胞顶上的纤毛对声音驱动的流体流动做出反应而变弯时，这种通道就会打开。

14.19 核受体调节转录

关键概念

- 核受体通过与染色体 DNA 上不同的短序列已知的应答元件结合来调节转录。
- 结合其他受体、抑制物或共活化物的受体形成了复杂的转录调控通路。
- 通过核受体的信号转导相对而言较慢，这同它们在适应性应答中的作用相一致。

核受体在细胞受体中是独特的，因为它们的配体可以无需协助而独立地穿过质膜。当受体同它们的配体结合后，就会进入核并调控基因的转录。核受体的配体包括性类固醇（雌激素和睾丸激素）和其他类固醇激素、维生素 A 和 D、类维生素 A 和其他脂肪酸、氧类固醇和胆汁酸。

核受体在结构上很保守。它们包含一个 C 端配体结合结构域，一个识别转录复合体并作为一个反式活化结构域而发挥作用的 N 端相互作用结构域，一个定位在中心的结合 DNA 的锌指结构域，通常在 C 端还有另一个反式活化结构域。在缺少配体时，这

些受体与抑制它们活性的辅阻遏物（corepressor）蛋白相结合。激素的结合使辅阻遏物分离，而且受体与共活化物（coactivator）组装成调节受体作用并促进转录调控的多蛋白复合体。如图 14.20（见图版）所示，激动剂和抗激动剂结合不同的受体构象（见 14.5 配体的结合改变了受体的构象）。受体激动剂促使受体同共活化物和 DNA 结合，而抗激动剂促使形成阻止共活化物和受体结合的构象。

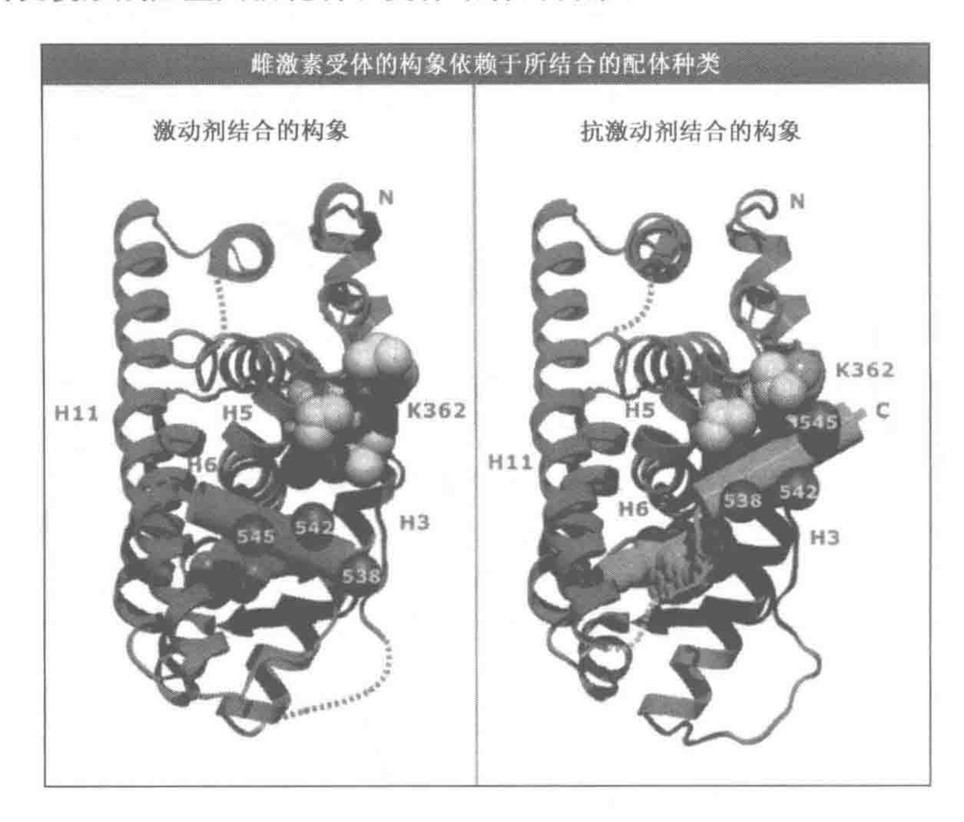


图 14.20　雌激素受体结合激动剂和抗激动剂时采用不同的构象。如左图所示，雌激素受体的配体结合区域结合激动剂雌二醇；右图是该区域结合抗激动剂那洛西芬。注意在螺旋 12 位置处标示的不同，活化结构中以蓝色标明，而在非活化结构中以绿色标明。图片复制自 Brzozowski，A. M，et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 389：753-758. 照片由 New York 大学的 M. Brzozowski 惠赠。

核受体同调控基因的 5′非转录区的激素**应答元件**的结合具有高特异性。应答元件通常是短的正向或反向重复序列，并且一个基因可能包括针对若干不同受体的应答元件和针对其他转录调节蛋白的结合位点。

性类固醇雌激素能够和两种不同的核受体结合，雌激素受体 ERα 和 ERβ。共活化物蛋白和辅阻遏物蛋白，在特异类型细胞中表达的转录复合体中特异性地调控 ERα 和 ERβ。同这些受体结合的其他配体包括有价值的治疗药物。例如，4-羟基三苯氧胺是一种雌激素受体抗激动剂，它用于雌激素受体阳性乳腺癌治疗中抑制残留的癌细胞的生长。尽管如此，同其抗激动剂对乳腺上的雌激素受体的作用不同，4-羟基三苯氧胺在子宫中显示出很弱的部分激动剂活性。在雌激素受体系统中，已知部分激动剂可选做雌激素受体调节子（SERM）。能够促进部分激动剂活性的特性包括：相关的两种雌激素受体 ERα 和 ERβ 的表达，以及同每种受体相互作用的辅阻遏物和共活化物的表达。因此，核受体配体的功能必须在组织、细胞和信号转导背景中加以理解。

14.20 G蛋白信号转导模块被广泛使用与高度适应

关键概念

- 基本模块是一个受体、一个G蛋白和一个效应子蛋白。
- 细胞表达每类蛋白质中的若干种类。
- 效应子是异源的并且启动不同的细胞功能。

G蛋白偶联受体（GPCR）的活化及其相联的异源三聚体G蛋白是最普遍的沟通细胞内信号和细胞外环境的机制之一。现已发现G蛋白信号转导模块存在于所有真核细胞中。根据不同的种类，哺乳动物表达500～1000种对激素、神经递质、信息素、代谢物、局部信号底物和其他调节分子应答的GPCR。本质上，所有的化学种类都可能成为GPCR配体。另外，有大致相等数量的嗅觉GPCR在嗅觉神经元中表达，并通过协同作用向动物所在环境中分泌化合物。因为GPCR参与许多种类的生理反应，它们也是最广泛使用的药物靶标之一。

一个最小的G蛋白信号转导模块由三个蛋白质组成：G蛋白耦联受体、异源三聚体G蛋白和效应子蛋白，如图14.21所示。受体对细胞外配体应答而活化质膜内面的G蛋白。然后G蛋白活化（或者有时是抑制）一个在细胞内传递信号的效应子蛋白。因此，信号在最简单的G蛋白模块中的转导是线性的。尽管如此，如图14.22所示，一个典型的动物细胞可能表达12种GPCR、6种以上的G蛋白和12种效应子蛋白。每种G蛋白调节若干效应子蛋白。另外，不同的效率和速率控制每种相互作用。因此，一个细胞的G蛋白网络事实上是一个信号整合的计算机，其输入是在幅度和动力学上都很复杂的细胞信号谱。由于它们的保守性，G蛋白模块很适合针对不同的分子输入信号应答而启动各种各样的细胞内信号，并能够发生在一个很宽的时间范围内（微秒到分钟）。

GPCR是完整的质膜蛋白，它由7个疏水的跨膜螺旋束组成，其N端在胞外，C端在胞质，如图14.23（见图版）。在视紫红质三维结构以及丰富的生化和遗传资料的基础上，可以推测所有的GPCR都具有共同的通过应答活化配体而使构象活化和钝化的基本机制（见14.5 配体的结合改变了受体的构象）。受体的细胞外表面与激动剂配体的结合促使了螺旋的重新排列，从而改变对异源三聚体G蛋白在胞质面的结合位点的结构，而这种发生改变的G蛋白结合表面构象会促使G蛋白的活化。

GPCR耦联的异源三聚体G蛋白包含一个核苷酸结合的Gα亚基和一个Gβγ亚基二聚体，如图14.24（见图版）。现已知这个三聚体和每个亚基的结构与活化阶段相关，通过与蛋白质相互作用形成复合体。一个Gαβγ异源三聚体是根据其α亚基命名的，它在很大程度上定义了受体间G蛋白的选择性。每种亚基可调控一群不同的效应子蛋白。

Gα亚基是球状的含两个结构域的38～44 kDa的蛋白质。GTP结合结构域属于包括小的单体G蛋白（如Ras、Rho、Arf；见14.23 小的单体GTP结合蛋白是多用开关）和GTP结合的翻译起始和延伸因子的GTP结合蛋白超家族。另一个结构域调节GTP结合和水解。Gα亚基是轻微疏水性的，但是由于构成的N端脂肪酰基化且它们同膜连接的Gβγ亚基的结合，它们主要为膜结合状态。根据相似的序列和功能，哺乳动

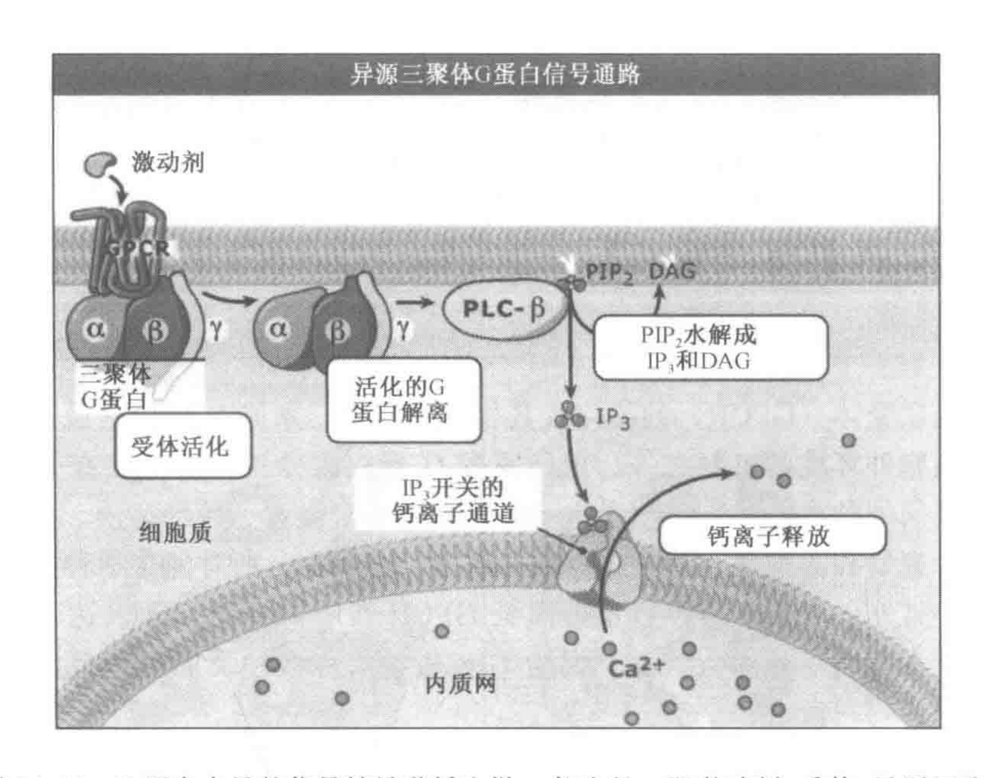


图 14.21 G 蛋白介导的信号转导遵循这样一条途径，即激动剂-受体-异源三聚体 G 蛋白-效应子-效应子输出。Gα 和 Gβγ 亚基都能调节不同的效应子。此处显示的例子中，Gq 调节一个磷脂酶 C-β 来产生两种第二信使甘油二酯（DAG）和肌醇三磷酸（IP_3）。IP_3 可引起 Ca^{2+} 从内质网中释放出来。

物有 16 种归入亚家族的 Gα 基因（如，s，i，q 和 12）。这些亚家族在图 14.25 中列出。

Gβ 和 Gγ 亚基在翻译后就不可逆地结合形成稳定的 Gβγ 二聚体，随后它会可逆地与一个 Gα 结合。Gβ 亚基是由 7 个 β-折叠重复形成一个 β 桶圆柱结构组成的 35kDa 的蛋白质。在哺乳动物中有 5 种 Gβ 基因。4 种编码能与 12 种 Gγ 亚基自然二聚化的非常相似的蛋白质（见图 14.24）。第五种 Gβ 蛋白（Gβ5）与其他几种的联系没有那么紧密，并且主要是与其他蛋白质上的一个 Gγ 样结构域相互作用，而不是自身的 Gγ 亚基。

Gγ 亚基比 Gβ 亚基更小（～7kDa）且在序列上更不同。Gγ 亚基的最后三个氨基酸残基发生蛋白水解从而留下一个保守的 C 端半胱氨酸，半胱氨酸被不可逆地 S-异戊烯化和羧甲基化，从而帮助 Gβγ 锚定在膜上。Gβ 和 Gγ 亚基在大多数可能的结合条件下都能结合。因为几乎所有的细胞表达多种 Gβ 和 Gγ 亚基，目前很难估计每种 Gβγ 结合的特定作用。目前对 Gβγ 亚基相互作用认识得最清楚的是在 Gβ 的一些位点上，虽然 Gγ 的不同功能也有一些研究结果。

14.21 异源三聚体 G 蛋白调节多种效应子

关键概念

- G 蛋白通过调节多种被认为是效应子的细胞内信号转导蛋白的活性来传达信息。
- 效应子在结构和功能上都是不同的。
- 在效应子蛋白中还未鉴定出一种通用的 G 蛋白结合结构域。
- 效应子蛋白整合来自多种 G 蛋白通路的信号。

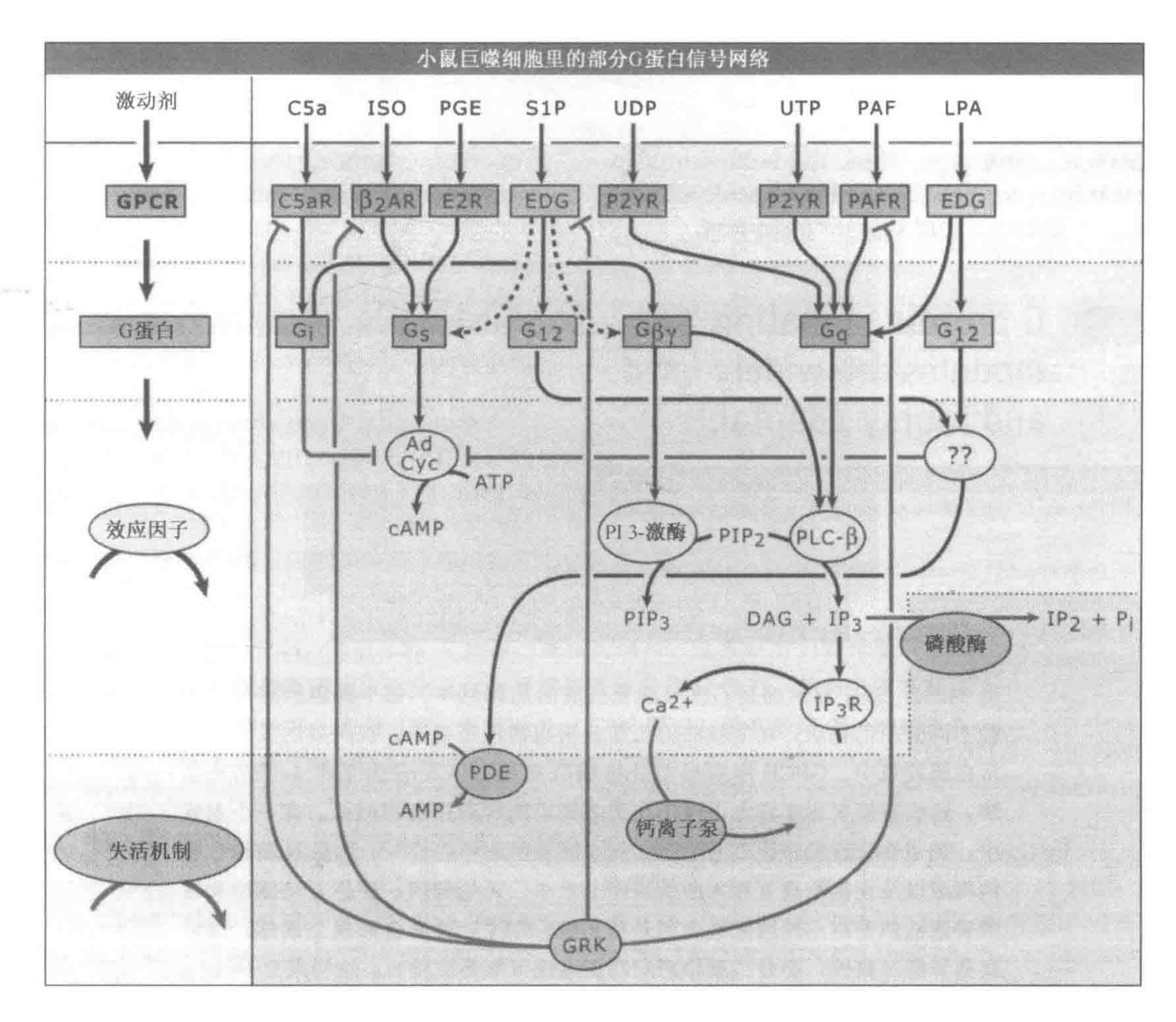


图 14.22 巨噬细胞中 G 蛋白介导的信号转导网络的一部分，显示了在这样的系统中可能的相互作用的复杂性。若干受体和 G 蛋白亚基被省略。表明 G 蛋白的地方，它的信号转导输出可能是由其 Gα 亚基介导的。任何 G 蛋白的活化也会活化它的 Gβγ 亚基，虽然 Gβγ 介导的信号转导通常很显然来自 G_i 三聚体。此外，若干 G 蛋白通过我们目前了解甚少的通路来调节其他的活性。显示的效应子例子很少，而且显示的唯一的适应性机制是 GRK 催化的受体磷酸化。数据来自细胞信号联盟的 Paul Sternweis。

G 蛋白调节的效应子包括形成或降解细胞内第二信使的酶（腺苷酰环化酶、环 GMP 磷酸二酯酶、磷脂酶 C-β、磷脂酰肌醇-3-激酶）、蛋白激酶、离子通道（K^+、Ca^{2+}）和可能的膜转运蛋白（见图 14.25）。效应子可能是完整的膜蛋白，或者是在膜表面结合 G 蛋白的特定的可溶性蛋白。在效应子蛋白中没有鉴定出保守的 G 蛋白结合结构域或序列基序，而且大部分效应子和具有相似功能但其不受 G 蛋白调控的蛋白质相关。因此，根据对 G 蛋白调节的敏感性独立形成多个调节蛋白家族。

由于它们能够对多种 Gα 和 Gβγ 亚基应答，所以效应子蛋白可以整合来自多个 G 蛋白通路的信号。不同的 Gα 或 Gβγ 亚基可能对一个特定的效应子有相反或增效的作用。例如，在哺乳动物中一些膜结合的腺苷酰环化酶被 $G\alpha_s$ 刺激而被 $G\alpha_i$ 抑制（见图

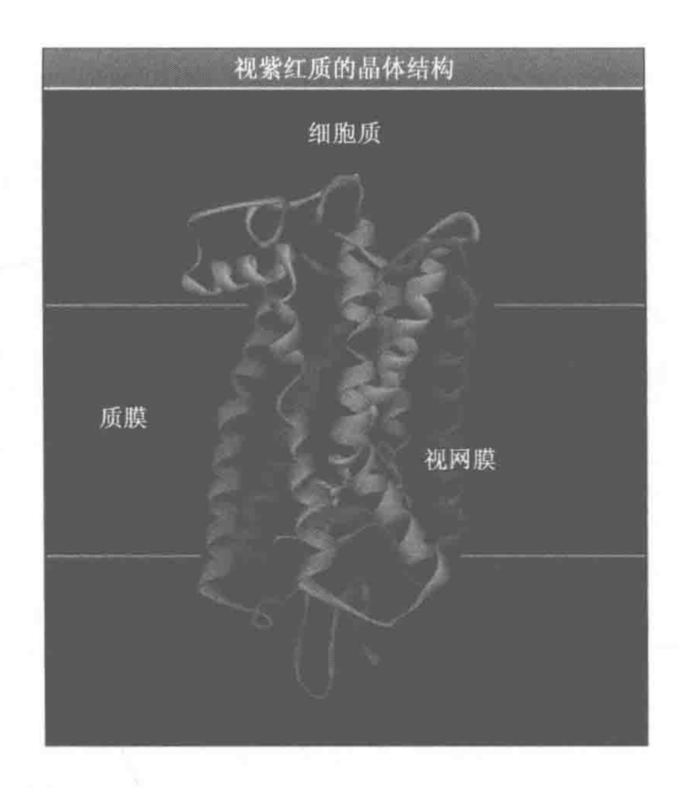


图 14.23　图中显示的是 GPCR 视紫红质的晶体结构。每个跨膜螺旋都用一种不同的颜色表示；在质膜面的大部分结构都没有显示。视网膜的发色团显示在螺旋束中。GPCR 序列类似处将哺乳动物 GPCR 分为至少 4 个结构家族，这些家族变化非常大以至于在类之间可能没有序列相似处。在一个家族中，类似性在跨膜螺旋中最显著，而在螺旋间的环中较少，而在 N 端和 C 端结构域以及连接跨膜五和六的质膜环上最少。无论如何，受体上功能结构域的普遍性似乎在不同的家族中都是适用的。GPCR 通常会形成二聚体，有时候是异源二聚体，而且二聚作用对功能来说可能是关键的。结构来自 Protein Data Bank file 1F88。

14.13)。许多效应子受到其他变构配体（如配体钙调蛋白）的进一步调控，也受到磷酸化调控，对信息整合有更重要的作用。

效应子通常用多种亚型表示，每种亚型可能受到不同的调控，增加了 G 蛋白网络的复杂性。例如，一些腺苷酰环化酶的亚型被 Gβγ 刺激，然而其他的则被抑制。所有的磷脂酶 C-β 都受到 $G\alpha_q$ 家族成员和 Gβγ 刺激，但是这两种输入信号的潜能和最大作用在四种 PLC- β 亚型间显著地变化。

14.22　异源三聚体 G 蛋白受到一个可调节的 GTPase 循环所调控

关键概念

- 当 Gα 亚基与 GTP 结合时，异源三聚体 G 蛋白被活化。
- GTP 水解为 GDP 使 G 蛋白钝化。
- GTP 水解很慢，但是 GAP 蛋白可以使其加速。
- 受体通过使 GDP 分离和 GTP 结合来促进活化；自发交换是很慢的。
- RGS 蛋白和磷脂酶 C-βs 是 G 蛋白的 GAP。

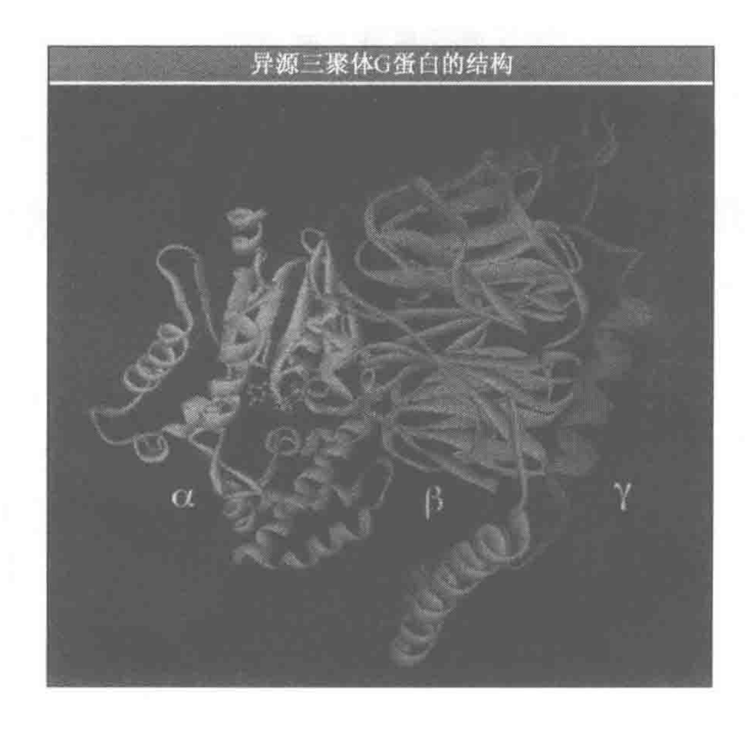


图 14.24 非活化的 G_i 异源三聚体的结构，这里显示引起抑制腺苷酰环化酶和引起大部分 Gβγ 介导的信号转导的 G 蛋白，其每个亚基都用不同的颜色表示出来。图中也显示 GDP 同 $G\alpha_i$ 亚基的结合。结构来自 Protein Data Bank file 1GP2。

G 蛋白靶点		
G 蛋白	效应蛋白	
	刺激	抑制
G_s G_{olf}	腺苷酸环化酶	
G_i（3） G_o G_z	钾离子通道，PI 3-激酶	腺苷酸环化酶
G_{gus}	其他的阳离子通道	
G_t（2）	环 GMP 磷酸二酯酶	
G_q（4）	磷脂酶-Cβ	
G_{12} G_{13}	Rho GEF	

图 14.25 G 蛋白调控的效应子并不具有结构相似性。它们可能是离子通道或质膜上的跨膜酶或膜内表面的外周蛋白或基本上能与 Gα 亚基结合的可溶性蛋白。这张表显示出的是根据序列相似性分类的主要 G 蛋白群，还有一些已知的它们所调控的效应子。

异源三聚体 G 蛋白信号转导中的关键事件是 GTP 与 Gα 亚基的结合，GTP 结合激活 Gα 亚基，进而使 Gα 和 Gβγ 亚基结合并调控效应子。只要 GTP 结合，Gα 亚基就维持活化状态，但是 Gα 也具有 GTP 酶的活性并将结合的 GTP 水解为 GDP。Gα-GDP 是没有活性的。因此 G 蛋白在 GTP 结合/活化和水解/钝化的 GTP 酶循环中转换，如图

14.26 所示。因此，G 蛋白信号转导调控本质上属动力学。信号的相对强度或幅度是与 G 蛋白的活性和 GTP 结合的形式相对应的。对应于 GTP 结合和 GTP 水解速率的平衡、GTP 酶循环的活化与钝化程度。每个部分都在 1000 倍以上的范围内被高度调控。

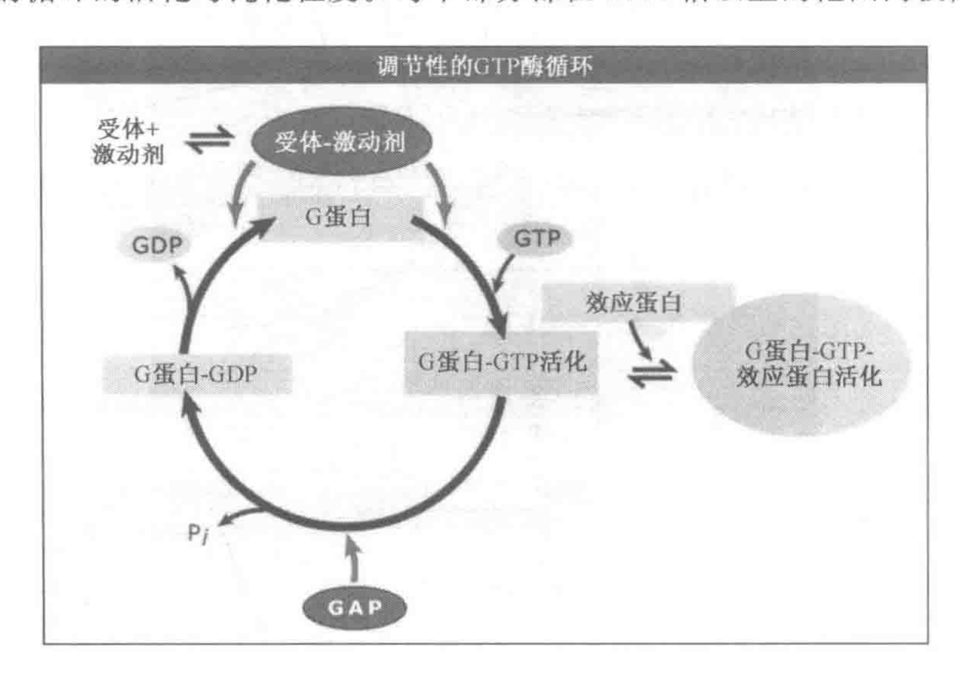


图 14.26　当 GTP 同 Gα 亚基结合后，G 蛋白被活化，Gα-GTP 和 Gβγ 都能够结合并调控适合的效应子蛋白。Gα 亚基也具有固有的 GTP 酶活性，而初级的钝化反应是将结合的 GTP 水解为 GDP（而不是 GTP 分离）。因此，这种来自一个受体 G 蛋白模块的稳定状态的信号输出是 GTP 结合状态下的部分 G 蛋白，它反映了活化和钝化速率的平衡。GTP 结合和 GTP 水解本质上都很慢并受到高度的调控。GDP 紧密地同 Gα 结合，GDP 分离对一个新的 GTP 分子的结合以及随后的再活化是速率限制性的。GDP 释放和 GTP 结合都是由 GPCR 催化的。结合的 GTP 的水解会由于 GTP 酶活化蛋白（GAP）的作用而加速。受体和 GAP 共同控制信号输出的稳定状态水平以及模块活化和钝化的速率。

受体通过开启 G 蛋白上的核苷酸结合位点而促进 G 蛋白活化，从而加速 GDP 分离和 GTP 结合。这个过程被认为是 GDP/GTP 交换催化作用。交换朝着活化的方向进行，因为 G 蛋白对 GTP 的亲和力比对 GDP 的亲和力高得多，还因为 GTP 的胞质浓度是 GDP 的 20 倍。自发的 GDP/GTP 交换对大多数 G 蛋白而言非常缓慢，因此将基本的信号输出维持在一个低水平。相反，受体催化的交换可使细胞中的应答非常迅速，如视觉光感受器、其他神经元或肌肉。

因为对 G 蛋白信号转导活性来说受体不是直接需要的，一个受体能够在 GDP/GTP 交换后与 G 蛋白分离然后催化其他的 G 蛋白分子活化。这样，一个单一的受体可维持多种 G 蛋白的活化，对输入信号进行了分子放大。其他一些受体可能保持与 G 蛋白靶标结合，这意味着它们不具有放大器的作用。尽管如此，结合受体越紧密就能越快地启动信号转导，并且当结合的 GTP 水解迅速时能促进 G 蛋白再活化。

在刺激缺乏时，Gα 亚基缓慢地水解结合的 GTP。Gα-GTP 复合体的平均活化寿命约是 10～150s，这取决于 G 蛋白。这个速率比将激动剂移除后经常在细胞中所观察到的钝化速率慢得多。例如，视觉信号转导受到光子刺激后约 10ms 内终止，而许多其他 G 蛋白系统几乎同样这么快。GTP 水解通过直接结合 Gα 亚基的 GTP 酶活化蛋白

(GAP) 的作用而加速。在某些情况下，加速超过 2000 倍。这样的速度在视觉或神经递质系统中是必需的，这些系统必须对改变的刺激快速应答。因为 G 蛋白信号转导是活化和钝化的一种平衡，GAP 消耗 GTP 活化的 G 蛋白库也能够抑制 G 蛋白信号转导。因此 GAP 能够抑制信号转导、在信号终止基础上结束输出或两者兼有。究竟那种占主导取决于 GAP 固有的活性与调控。

对异源三聚体 G 蛋白来说有两个 GAP 家族。RGS 蛋白（G 蛋白信号转导的调节子）是一个约有 30 种蛋白质的家族，它的大部分或全部都具有 GAP 活性，并调节 G 蛋白信号转导速率和幅度。RGS 蛋白在终止 G 蛋白信号中的作用可见图 14.27。一些具有 RGS 结构域的蛋白也起到 G 蛋白调节性效应子的作用。这些包括单体 GTP 结合蛋白 Roh 家族的活化物（见下文）和 GPCR 激酶，它们是 GPCR 功能的反馈调节因子。第二组 G 蛋白 GAP 是磷脂酶 C-β。这些酶是被 Gαq 和 Gβγ 刺激的效应子，但是它们具有 Gq GAP 的作用，可能是为了控制输出动力学。

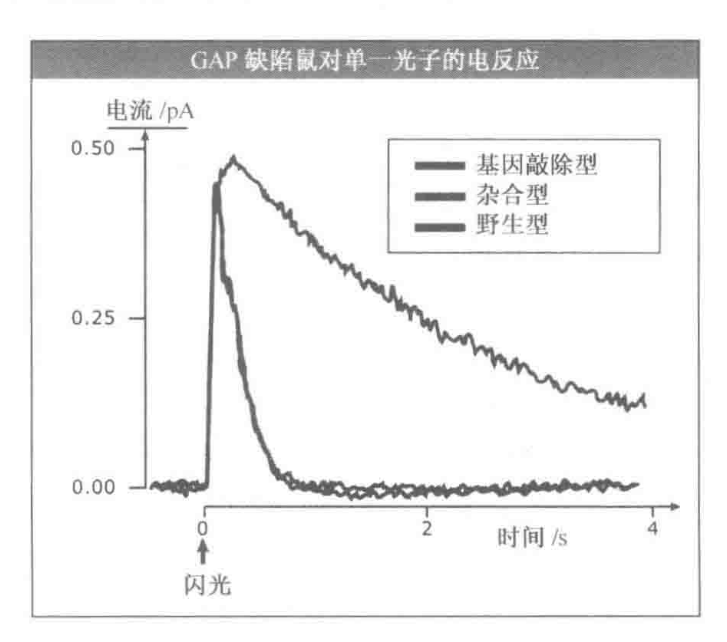


图 14.27 G 蛋白的 GAP 在激动剂移除的基础上能够加速信号终止，通常在对受体应答中并不起抑制物的作用。此图显示的是一只小鼠的光感受器（杆）细胞对一束单一光子的电反应。在缺乏 RGS9 的小鼠中，对光感受器 G 蛋白的 GAP 是 G_t，信号被延迟许多秒，因为同 G_t 结合的 GTP 的水解非常缓慢。在野生型或杂合小鼠中，水解发生在约 15ms 内，并且信号的衰退十分迅速。我们注意到最大输出在野生型小鼠和突变小鼠中是相似的，表明 GAP 在杆状细胞中并不是起到抑制因子的作用。在人类中，RGS9 的遗传缺失会导致严重的视觉缺陷。复制自 Chen et al. *Nature*. 2000. 403：557－560。获得 Virginia Common wealth 大学的 Ching-Kang Jason Chen 许可。

如图 14.26 所描述的 GTP 酶循环普遍存在，但此图被高度简单化了。受体、Gα、Gβγ、GAP 和效应子间的相互作用通常是同时发生的，并且经常有复杂的协同相互作用。例如，Gβγ 抑制 GDP 的释放（使自发的活化最小化），促进受体的交换催化剂活性，抑制 GAP 活性，并协助起始导致脱敏作用的受体磷酸化。其他的组分基本上也是这类多种功能。此外，来自其他蛋白质的输入信号能够在一些点上改变 GTP 酶循环的

动力学。因此，核心G蛋白模块作为一种信号处理器在功能上是多能的，而且在其靶标的范围上也是多能的。

14.23 小的单体GTP结合蛋白是多用开关

关键概念

- 小GTP结合蛋白与GTP结合时有活性，而与GDP结合时则无活性。
- 已知的GDP/GTP交换催化剂GEF（鸟嘌呤核苷交换因子）可促进活化。
- GAP可加速水解和钝化。
- GDP分离抑制因子（GDI）可减慢自发的核苷交换。

在动物中调节各种细胞生命过程的单体GTP结合蛋白约由150个基因编码，包括信号转导、细胞器转运、细胞器内运输、细胞骨架装配和形态发生。在细胞信号转导中功能最为清楚的小GTP结合蛋白是Ras和Ras相关蛋白（Ral、Rap）以及Rho/Rac/Cdc42蛋白，总共约有10～15种。它们通常是20～25kDa大小，而且与Gα亚基的GTP结构域同源。

小GTP结合蛋白的调节活性是由GTP的结合以及与异源三聚体G蛋白一样的水解循环控制的，与更小的调节输入信号相关。它们被GTP活化，并通过将结合的GTP水解为GDP而终止其活性。GDP/GTP交换催化剂，如已知的GEF（鸟嘌呤核苷交换因子，功能上类似于GPCR），能够促进活化，而且GAP会加速水解以及随之发生的钝化。此外，GDP分离抑制因子（GDI）会减慢自发的核苷交换以及抑制基本活性的激活。

当单体和异源三聚体G蛋白在生化调节事件中本质上相同时，单体G蛋白以另外的方式利用基本的GTP酶循环。通过异源三聚体G蛋白和许多单体G蛋白输出的信号，通常被认为反映了在GTP酶循环快速转换中它们活性状态（GTP结合）与非活性状态（GDP结合）的一种平衡。GEF适于更有活性的G蛋白构象，而GAP适于无活性的状态。相反，或许相等数量的单体G蛋白以灵敏的开关转换方式起作用。在结合GTP的基础上，它们会起始一个过程（调控、募集其他蛋白）。然后它们就一直保持这种活性，有时可以达到很长一段时间，直到它们被GAP活化。例如，作为单体G蛋白的Ran蛋白，它和被称为核运输受体蛋白的载体蛋白协调作用，双向调节核质和胞质间运输蛋白和RNA（见5.15 Ran GTPase控制细胞核运输的方向）。在细胞核中，高活性的Ran-GEF促进GTP的结合。随后细胞核的Ran-GTP结合核输入受体蛋白驱动新运入物质的解离，并且促进核受体蛋白返回到细胞质中。它也可以结合核输出受体蛋白，促进核质物质向胞质的运输。在细胞核外，高活性的GAP促进GTP的水解。细胞质的Ran-GDP从核输出受体蛋白分离，促进向核外输出复合体的解离，而它与核输入受体蛋白分离，促进核输入复合体的结合进而促进物质向核内运输。因此，对于单体G蛋白，例如Ran，GTP酶循环的每一个时期确定了在一个平行的调节周期中的一个特异的耦联步骤。

在单体G蛋白和异三聚体G蛋白之间还有一个主要差异，那就是GEF、GAP和GDI的结构。从结构上讲，单体GTP结合蛋白的GEF和GAP是异源的（虽然一些家族相关性很明显）。此外，调节这些GEF和GAP的机制也同样是多种多样的。这些机

制包括蛋白激酶的磷酸化；被异三聚体和单体G蛋白以及被第二信使和其他调节蛋白调节的异构化；亚细胞分割和支架蛋白的重组；以及一些被确认的其他机制。

Ras蛋白是第一个被发现的小的GTP结合蛋白。它们是原癌基因产物，因为如果它们过表达或者因为突变持续活化状态，便可引起细胞的恶性增长。它是人体肿瘤中最易突变的基因之一。几种病毒的Ras基因被确认为原癌基因。

恶性细胞包含三个Ras基因（H、N和K），它们在某种程度上有相同的输入和输出机制。在某些基因筛选中它们可以互相替代，确定某一特异的Ras蛋白具有哪种独特的功能是困难的。Ras蛋白的活化也是多种多样的，这说明了它在信号通路中的重要作用。

Ras的GEF和GAP被受体和非受体酪氨酸蛋白激酶信号通路调节，这种调节通过直接的磷酸化和质膜上的调节蛋白重组来完成。其他的胞质丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶也参与作用将Ras活化。Rap1，另外一个Ras家族成员，也可能直接参与这种信号通路网络，因为有人猜想它和Ras竞争蛋白激酶的催化部位。在体内，它可以抑制Ras的原癌基因活性。然而Rap1被单独调节，并且还在单独的信号通路中起作用。例如，在它的GAP中，其中有一个可以被G蛋白的Gi类活化，而且它的几个GEF被Ca^{2+}、DG和cAMP活化。

一般来讲，Ras蛋白通过调节多种效应蛋白的活性来调节细胞生长、细胞增殖和细胞分化。最著名和研究得最清楚的Ras蛋白效应物是蛋白激酶Raf，它可以启动MAPK信号通路。图14.28显示了Ras的效应物。

Ras有三个主要的效应物		
功能	效应物	靶标
蛋白激酶级联反应	Raf	MAPK
脂类激酶	PI 3-激酶	Akt
交换因子	PalGDS	Exocyst

图14.28 Ras-GTP结合许多蛋白。三个已经建立的效应子包括Raf、PI3激酶和RalGDS。这些效应子的活化激活了MAPK通路，增加了PI3激酶的活性，并促进了一种涉及囊泡胞吐分泌的蛋白复合物组装。

Rho、Rac和Cdc42是相关的单体GTP结合蛋白，它们参与启动影响细胞形态的信号通路。这些蛋白中的每一种可以调节它的一系列的效应物，并且被各自的GEF、GAP和GDI所调控。这些蛋白调节的效应物包括磷脂酶C和D，多种蛋白和脂蛋白激酶，成核和识别肌动蛋白微丝的蛋白。中性粒细胞氧活化系统的组分，以及一些其他的蛋白质（见8.14 小G蛋白调控肌动蛋白聚合）。

14.24 蛋白磷酸化/去磷酸化是细胞中的一个主要调控机制

关键概念

- 蛋白激酶是一个大的蛋白家族。
- 蛋白激酶磷酸化丝氨酸和苏氨酸或者酪氨酸或者全部三种氨基酸。
- 蛋白激酶可以识别磷酸化位点周围的主要氨基酸序列。
- 蛋白激酶更倾向于识别处于未折叠结构域中的磷酸化位点。

蛋白磷酸化是调节翻译后修饰的最主要的形式。它发生在所有的生物中，并且据估计在动物中大约有 1/3 的蛋白质在不同的时间发生磷酸化。磷酸化可以活化或者抑制酶的催化活性，一种蛋白质与另一种分子结合的亲和力，蛋白质的亚细胞定位，进一步共价修饰的能力，或者它的稳定性。单一的磷酸化可以引起蛋白质折叠 500 倍或使活性发生较大的改变。磷酸化经常发生在蛋白复合体和相互作用蛋白的多个残基上。

在真核生物中绝大部分蛋白都发生磷酸化，在动物中基本上所有的蛋白都被蛋白激酶催化磷酸化；蛋白磷酸酶催化去磷酸化。酶的所有类型都被多种机制控制。此外，蛋白经常被多种蛋白激酶磷酸化，从而产生一系列活性状态。这种复杂性使得来自不同信号通路的信号一起整合共同调控靶分子的活性。

在细菌、植物和真菌中，被称为双信号通路的另外一种蛋白磷酸化是非常重要的。参与双信号通路的蛋白激酶与真核生物的蛋白激酶超家族是不相关的，它磷酸化天冬氨酸残基而不是丝氨酸和苏氨酸，或者酪氨酸。

从化学角度来讲，蛋白激酶从 ATP 中转移磷酸基团到蛋白底物的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上形成稳定的磷脂，就像图 14.29 显示的一样，在动物中这三种氨基酸上连接的磷酸不是平均的，丝氨酸上约为 90%～95，苏氨酸上约为 5%～8%，酪氨酸上不到 1%。人类基因组中大约包括 500 种编码蛋白激酶的基因，而且许多蛋白激酶的 mRNA 可进行选择性剪切。这就使得蛋白激酶基因超家族成为最大的功能基因超家族之一。这些酶的数量和多样性充分说明调节细胞功能的蛋白激酶种类众多与功能多样。尽管一些蛋白激酶有组织特异性或者发育时间特异性，但许多蛋白激酶是广泛表达的。

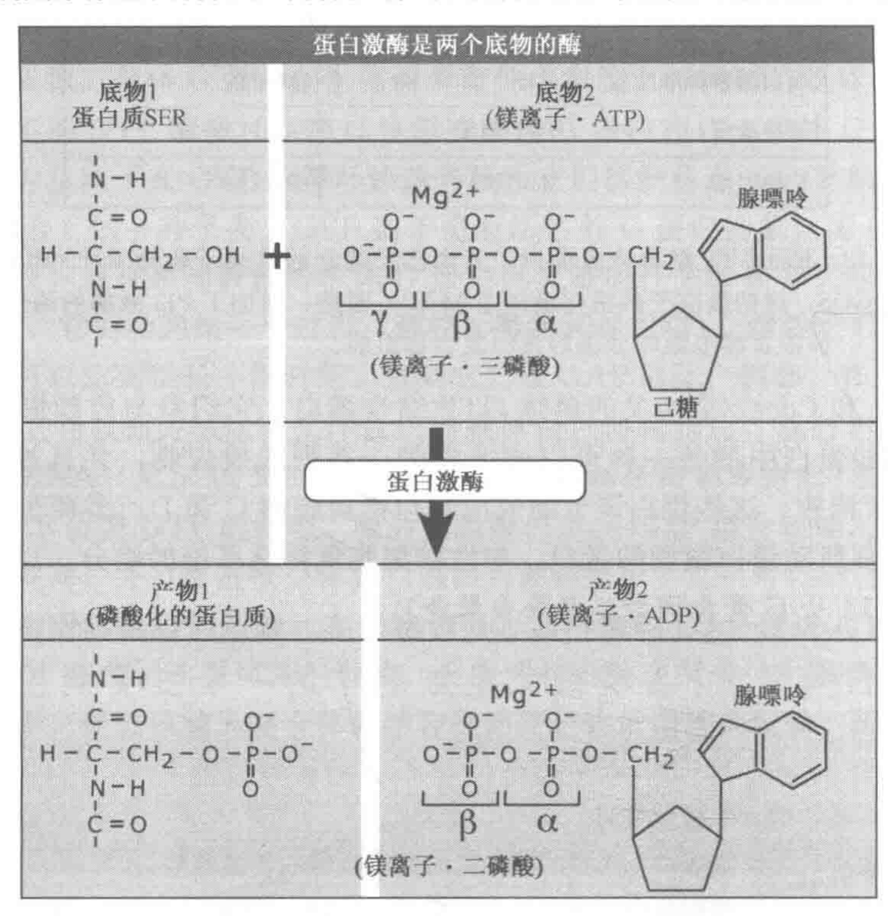


图 14.29　蛋白激酶将 ATP 的 γ 磷酸基团转移至蛋白质底物的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基。

蛋白激酶根据它们的磷酸化残基特异性分类。磷酸化丝氨酸的蛋白激酶经常也可以识别苏氨酸，因此命名此蛋白为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。多细胞有机体有酪氨酸蛋白激酶，它仅仅识别酪氨酸。双特异性的蛋白激酶可以磷酸化丝氨酸和苏氨酸，并且在合适的限制性的亚基构象条件下也可以磷酸化酪氨酸，这种双特异性的蛋白激酶一般来讲是最具有选择性的。

根据序列相关性，对几种有机体的**蛋白激酶组**的分析确定了更加精确的分类系统（图 14.30)，在某种程度上也反映了调节机制和底物特异性。例如，AGC 族根据它的组成成员命名，cAMP 依赖性蛋白激酶（PKA)、cGMP 依赖性蛋白激酶（PKG)、Ca^{2+} 和磷脂依赖的蛋白激酶（PKC)，这些酶被第二信使调节，并且对于那些在磷酸化位点附近具有基本残基的底物有更高的亲和力。

除了底物氨基酸残基特异性之外，绝大多数蛋白激酶对底物位点周围的局部氨基酸序列有选择性。对于多种多样的蛋白激酶来说，筛选策略已经产生了预测蛋白是否含有保守的亚基位点的方法。局部识别后，在所有三维结构基础上的相似蛋白间或是通过特异的磷酸化或泛素化共价修饰的蛋白间蛋白激酶都显示出显著的底物选择性。

在动物细胞中，一些蛋白激酶是跨越质膜的激素受体。一些蛋白激酶受体是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，如转化生长因子-β（TNF-β）受体，但是大部分是酪氨酸蛋白激酶，包括胰岛素、表皮生长因子（EGF)、血小板来源的生长因子（PDGF）和其他细胞生长和分化的调节因子的受体。其他蛋白激酶在本质上是可溶性的细胞内的酶，虽然它们可能结合于一个或更多的细胞器膜上。

蛋白激酶的 X 射线晶体学结构显示出许多关于它们活化机制的信息。一个蛋白激酶保守的最小的催化核心包括约 270 个氨基酸，形成一个约 30kDa 的最小的分子群。在这个核心中，有两个折叠的结构域，在其分界面形成活性位点，如图 14.31。保守的赖氨酸（Lys）或对磷酰基转移所必需的天（门）冬氨酸（Asp）残基中的一个或两个突变通常就会破坏激酶活性。靠近活性位点的一段序列被认为是活性环，通常经过一个构象的重排来产生蛋白激酶的活性形式，并且是蛋白激酶家族中最普遍的调节磷酸化位点。蛋白激酶表面特异性插入形成特异性定位、与其他的调节分子相互作用、与底物的相互识别。这些标志使得蛋白激酶的分类和基因操纵成为可能。

蛋白激酶已经进化出大量的多种多样的的调节机制，充实它们的数量并完成多种功能。这些机制包括被脂类、可溶性小分子和其他蛋白的别构效应激活或抑制；活化或抑制性蛋白磷酸化和其他共价修饰，包括蛋白水解作用；结合支架蛋白和接头蛋白来提高活性和限制非特异活性。许多这样的活化以一种复杂的结合方式调节单一的蛋白激酶。进一步说，持续作用的多功能蛋白激酶可以产生独特的复杂信号通路，例如蛋白激酶信号通路（见图 14.38)。

14.25 双向蛋白磷酸化系统是信号转导的中转装置

关键概念

- 双组件信号转导系统由感应器和效应调节因子组成。
- 一旦接受活化剂，感应器组件在组氨酸残基上进行自身磷酸化。
- 将磷酸基团转移到应答调节因子的天冬氨酸残基上，将调节子激活。

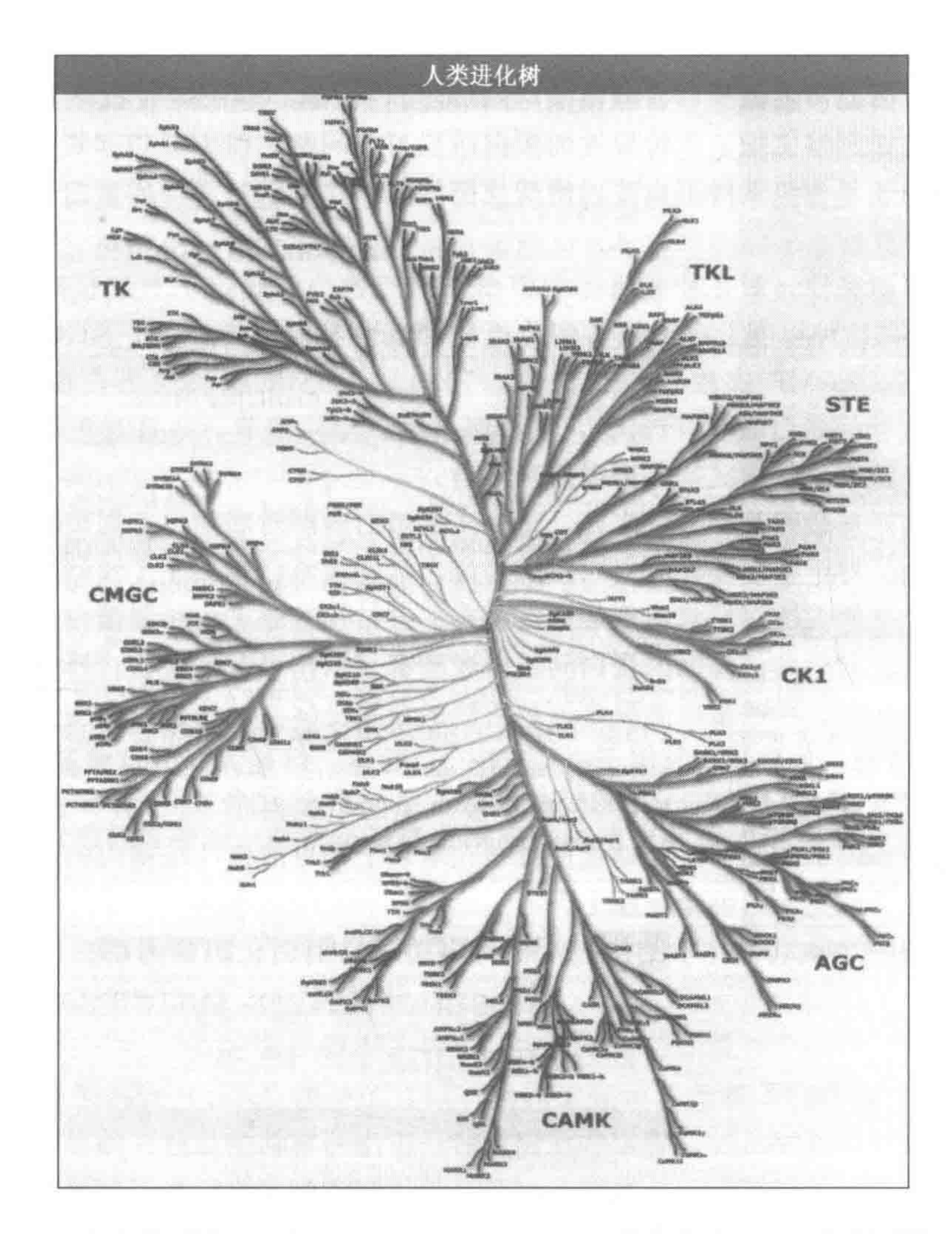


图 14.30 在人类基因组中的蛋白激酶可以根据显示出的 7 个主要分支的序列关系进行分类。酪氨酸激酶被包含在一个主要的分支中。其他的则是丝/苏氨酸特异性或双重特异性的，并以最熟悉的成员命名：AGC 来自 PKA、PKG 和 PKC；CAMK 来自钙、钙调蛋白依赖性激酶；CMGC 来自 CDK、MAPK、GSK3、Clk；CK1 来自酪蛋白激酶 1；STE 来自 Ste20、Ste11、Ste7 以及酵母繁殖通路中的 MAP4K、MAP3K 和 MAP2K；TKL，Tyr 激酶样的酶。经许可复制自 G. Manning，et al. 2002. Science. 298：1912-1934. © 2002 AAAS. 照片由 Salk 研究所的 Gerard Manning 惠赠，并经许可复制自细胞信号科技公司（www. cellsignal. com)。

原核生物、植物和真菌有相同的可选择机制来调节双组件信号通路的磷酸化和去磷酸化。图 14.32 显示了一个典型的双信号组件系统，在这个系统中，受体是一个感应器，接受活化物刺激后，催化自身的组氨酸磷酸化。感应器包括细菌中的化学诱导物受体、真菌光活化蛋白中的膜通透性调节因子、植物成熟激素乙烯的受体，以及其他的各种各样的环境、激素和代谢信号。从氨基酸序列上来讲，哺乳动物线粒体的乳酸脱氢酶和细菌的组氨酸激酶是相关的，尽管哺乳动物中该酶催化丝氨酸和苏氨酸，而在细菌中

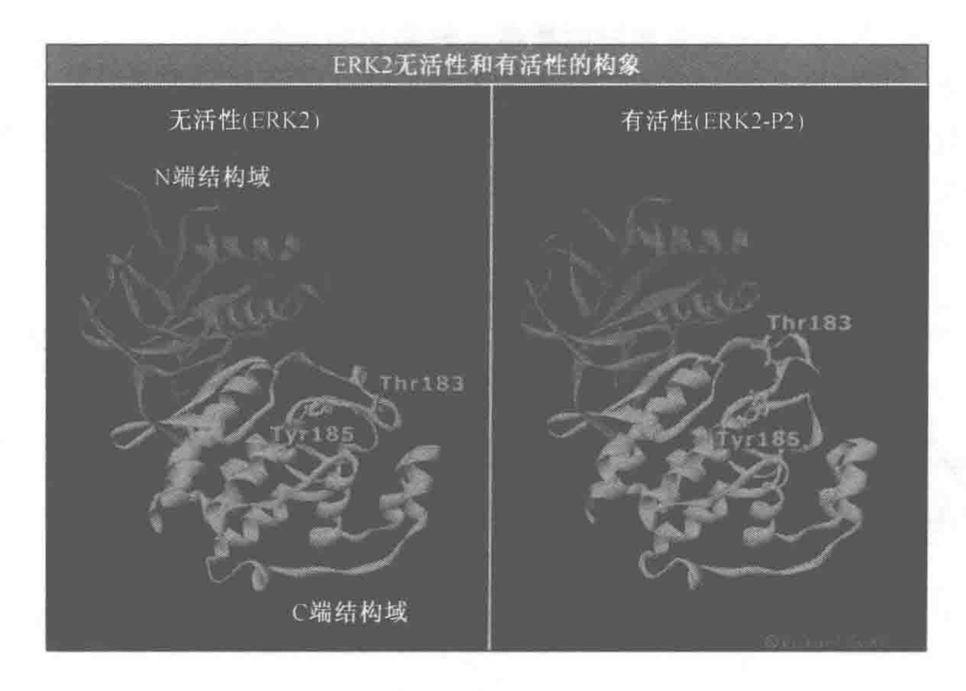


图 14.31 MAPK、ERK2 的磷酸化前后（即活化前后）结构的比较。ERK2 有一个典型的蛋白激酶结构，小的 N 端主要由 β 折叠组成，大的 C 端主要是 α 螺旋。活性位点在两个结构域之间的界面上。在活性部位酪氨酸和苏氨酸磷酸化后，活性部位随后重新折叠，并且诱导活性部位残基的重新定位。ATP（未显示）结合在活性部位的内部，由于活性环的重新组织，蛋白底物与酶的 C 端结构域表面的结合加快。结构来自 Protein Data Bank files 1ERK 和 2ERK。

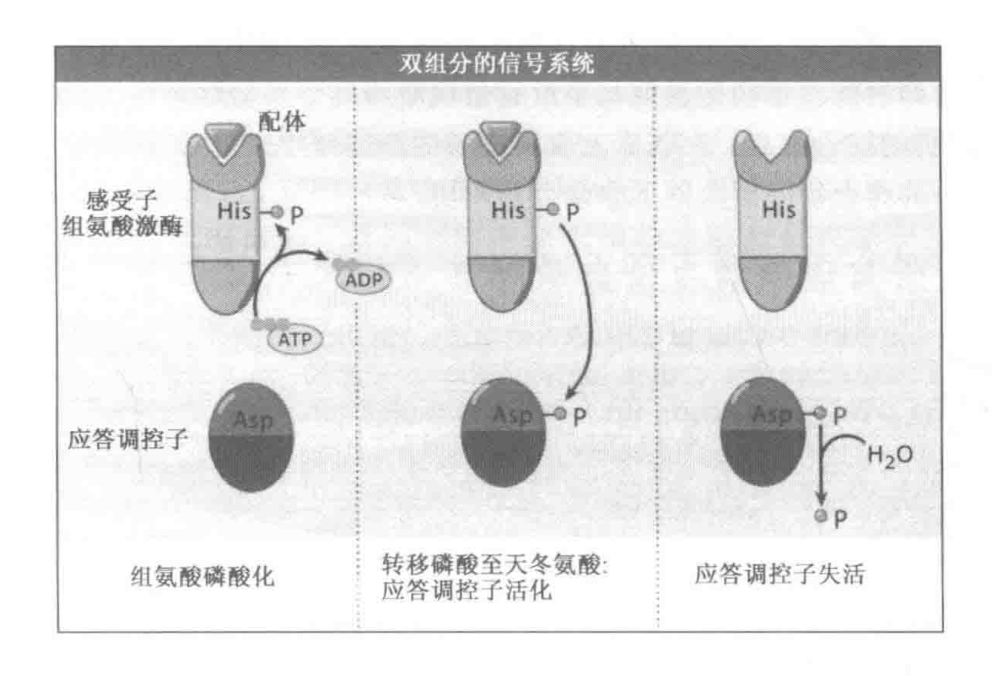


图 14.32 基本的双组分系统由一种信号活化的组氨酸激酶组成，包括感应器和效应子蛋白，当它们在感应器的天冬氨酸残基磷酸化时，效应调节器被活化，当天冬氨酸残基的磷酸基被水解时便失活。

为组氨酸。随后磷酸化的感应器将转移它的共价磷酸化信号给下一个被称为效应调节子的天冬氨酸残基上。效应调节器经常通过结合其他胞质蛋白来别构调节它们的活性最终启动细胞效应。

尽管所有的双组件系统都是相同的类型，但是它们的结构和反应通路却大不相同。一些双组件系统仅仅由一个蛋白组成（感应器和效应子在一条多肽链上）。其他的系统则是由一个效应子蛋白和两个天冬氨酸被磷酸化的蛋白组成，在这两个蛋白中，第一个或是第二个有调节活性。最后，双组件系统经常缺乏常规的蛋白磷酸酯酶，天冬氨酸磷酯键的水解是自发的或者是被效应调节器自身调节的。

14.26 蛋白激酶的药物抑制剂可用于研究和治疗疾病

关键概念

- 蛋白激酶抑制剂用于信号通路研究和药物。
- 蛋白激酶抑制剂经常结合到 ATP 结合位点上。

由于研究的需要，人们开发出许多抑制剂来研究蛋白激酶的功能。在疾病发生过程中，这些酶在发病过程中的重要性也使它们成为进行药物筛选的靶点，筛选工程生产出了许多蛋白激酶的抑制剂。绝大多数的药物抑制剂竞争 ATP 的结合位点。由于在细胞中有大量的 ATP 结合蛋白，因此不可避免地要关心这些抑制剂的特异性，包括其他蛋白激酶以及结合核苷酸的其他蛋白。通过化学文库的筛选，基于结构的主要化合物的修饰，抗蛋白激酶的抑制剂测试，各个方面的成功已经明显缓解了这个难题。

例如，许多 PKA 或 PKC 的抑制剂对 AGC 家族的其他几个成员也有抑制效应。尽管对 PKA 产生作用的药理学抑制剂比较多，它们大多数来自于自然产生的被称为 PKI 和 Walsh 的小抑制蛋白。体外和基于细胞的筛选鉴定出 ERK1/2 信号通路中 MAP2K 大量筛选出的抑制剂。这些抑制剂几乎没有蛋白激酶的交叉活性，这可能是因为它们不能结合到 ATP 的结合位点。在临床上取得进展的抑制剂中，抗 EGF 受体和某些其他酪氨酸蛋白激酶的化合物方面取得了非常大的成功。

14.27 磷蛋白磷酸酶与蛋白激酶作用相反并受到单独调控

关键概念

- 磷蛋白磷酸酯酶与蛋白激酶作用相反。
- 磷蛋白磷酸酯酶可以将丝氨酸/苏氨酸或者丝氨酸/苏氨酸、酪氨酸三者去磷酸化。
- 磷蛋白磷酸酯酶经常通过形成特异蛋白复合体来决定它的特异性。

蛋白磷酸化被磷蛋白磷酸酶逆转。这些酶显示出自身的特异性和调节模式。基于磷蛋白磷酸酶的特异性和序列相关性它们可分成两大类，即丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶和酪氨酸蛋白磷酸酶。

大部分的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶通过和其他蛋白结合调节其活性。靶向定位是底物特异性的主要决定因素。蛋白磷酸酶 1（PP1）和许多调节亚基结合，这些调节亚基可以特异地引导它到达相关细胞器。例如，一个亚基（称为 G 亚基）特异性地与糖原颗粒结合。与这个亚基的相互作用通过磷酸化自我调节。小蛋白抑制剂可以抑制 PP1 的活性。

磷蛋白磷酸酶2A（PP2A）由一个催化亚基、一个支架蛋白亚基，以及多个调节亚基中的一个组成。调节亚基调节蛋白磷酸酶的活性和定位。许多病毒通过干扰蛋白磷酸酶的活性来调节细胞的行为。例如，被SV40感染的细胞可以表达一种被称为小t抗原的病毒蛋白。这种小t抗原蛋白可以置换PP2A的调节亚基，并因此改变蛋白磷酸酶的活性和亚细胞定位。此外，在体外和在完整的细胞中，天然毒素在不同程度上可以抑制PP2AH和PP1的活性，例如软海绵酸、花萼海绵诱癌素、微囊藻素。

另外一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶称为钙调神经磷酸酶（也被称为磷蛋白磷酸酶2B），它被钙调蛋白（见图14.15）调节，并且在心脏的发育和T细胞的活化以及其他事件中起重要作用。免疫抑制孢环素和FK506的主要作用机制就是抑制钙调神经磷酸酶。

酪氨酸蛋白磷酸酶是半胱氨酸依赖的酶，它由保守的Cys-Xaa-Arg基序来水解底物的磷脂键。在人体中，酪氨酸蛋白磷酸酶由100多个基因编码，分为四个亚家族：酪氨酸特异的磷酸酶、Cdc25磷酸酶、双特异性磷酸酶（DSP），以及低分子质量的磷酸酶。

酪氨酸蛋白磷酸酶中有38种对于底物的磷酸酪氨酸残基具有高度选择性，其中一些是跨膜蛋白，其他的是膜连接蛋白。它们最明显的功能是逆转酪氨酸蛋白激酶的作用，然而还有一些酪氨酸蛋白磷酸酶的主要功能是介导酪氨酸蛋白激酶的信号转导。例如，酪氨酸蛋白磷酸酶SHP2（也被称为SHPTP2），通过它的SH2结构域结合某一种酪氨酸蛋白激酶的受体，使自身的酪氨酸磷酸化，为含有SH2结构域的接头蛋白（Grb2）产生一个结合位点，而Grb2可使Ras的活化（见图14.32）。

Cdc25磷酸酶可以识别作为底物的周期蛋白依赖性蛋白激酶（CDK）家族成员，在细胞周期循环的关键点起到提高CDK活性的重要作用（见图14.39和11.4细胞循环是CDK功能的循环）。与双特异性蛋白激酶相似，双特异性蛋白磷酸酶特异性限于有限数量的底物。大量的双特异性蛋白磷酸酶使得MAPK去磷酸化；这些双特异性蛋白磷酸酶被称为MAPK磷酸酶（MKP）。其中几种在MAPK的入核和出核转运中起作用。一些MKP由早期应答基因编码，这些基因产物在细胞周期即将启动时被活化（见图11.7）。

其他的酪氨酸蛋白磷酸酶家族成员的底物，如肿瘤抑制因子PTEN，包括**磷脂酰肌醇**，即作为第二信使的甘油磷脂酰肌醇的磷酸化衍生物（见图14.16）。磷酸基团的去除使得第二信使失活，这组成员是专门作用于磷脂酰肌醇还是也作用于蛋白的酪氨酸磷酸还不清楚。

14.28 泛素和泛素样蛋白引起的共价修饰是调控蛋白功能的另一种途径

关键概念

- 泛素和相关的小蛋白可作为靶向信号共价结合到其他蛋白上。
- 泛素被各种泛素结合蛋白识别。
- 泛素化可以与其他的共价调节协同作用。
- 除了降解蛋白的功能外，泛素化可以调节信号转导。

利用**泛素**家族小蛋白进行共价修饰是一种重要的蛋白功能调控机制。泛素是类泛素蛋白家族成员之一。在不同的物种中，泛素本身是高度保守的，表明泛素中所有 76 个氨基酸残基的功能重要性，泛素除了明确具有降解蛋白质的功能之外，泛素修饰在信号转导中还有各种功能。

Ubl 蛋白可以通过异肽键与底物的氨基连接，这种连接通常是底物的赖氨酸侧链上的氨基与 Ubl 蛋白 C 端的甘氨酸残基。底物与泛素的连接需要 E1、E2、E3 蛋白(见 BCHM-14-0001)。通过一系列多聚泛素链的形成，几个 Ubl 蛋白可以连接到一个底物上，单体和多聚泛素都可改变蛋白行为诱导下游信号。单泛素化在膜泡运输和 DNA 修复过程中是一种重要的调控修饰。例如，单泛素化形式的 FANCD2 蛋白在 DNA 修复位点与修复蛋白 BRCA1 相结合。Ubl 蛋白 SUMO 的修饰在核转运、转录和细胞周期进程中发挥着作用。

当泛素自身的赖氨酸残基，尤其是 K48 和 K63 被泛素化时，多聚泛素链就形成了。K48 连接的多聚泛素通常引导蛋白质到达蛋白酶体进行降解，而多聚泛素链与 K63 的结合则会促进信号转导，而不是蛋白水解。蛋白结合的泛素能够被多种泛素结合结构域所识别，包括 UIM（泛素作用区）、UBA（泛素相关区域）以及一些锌指结构。这些结构域能够具有被修饰蛋白的泛素受体的作用。

转录因子 NF-κB 的活化是经过一个依赖连接 Ubl 蛋白和磷酸化的修饰机制而实现的。泛素调控的例子如图 14.33 所示。在刺激之前，NF-κB 通过与其抑制子 IκB 结合而以一种钝化的形式滞留在胞质中。由 IκB 激酶（IKK）复合体催化的 IκB 的磷酸化会促进它被多亚基 E3 连接酶所识别，从而导致其泛素化以及随后的蛋白酶降解。IκB 的消除使 NF-κB 移动到细胞核中介导转录的变化。

IκB 能够通过与 Ubl、SUMO 的共价连接应答某些信号而变得稳定。翻译后蛋白修饰同样发生在必须与泛素连接从而使 IκB 降解的赖氨酸残基上。因此，SUMO 连接稳定了 IκB，并且减弱 NF-κB 的反应。这是 Ubl 之间结合的无数例子中的一个。

在 NF-κB 信号转导中的一个关键的调控事件是 IKK 复合体的活化。IKK 自身是由泛素化和磷酸化调控的。细胞因子白介素-1β（IL-1β）会引起接头蛋白与其受体的结合，从而形成一个受体活化复合体。白介素-1β 受体活化复合体募集另一种包含 TRAF6 的接头蛋白复合体。磷酸化使 TRAF6 复合体从受体活化复合体上释放到胞质中。

TRAF6 包含一个 RING 结构域，它是一种催化蛋白激酶 TAK1 上 K63 多聚泛素链形成的 E3 泛素连接酶。多聚泛素化的 TAK1 随后能够募集具有保守的锌指结构域的接头蛋白 TAB2 和 TAB3。这些特殊的锌指结构域结合多聚泛素化的 TAK1 以增强其活性。因此，被活化的 TAK1 接着磷酸化并活化 IKK，IKK 随后磷酸化 IκB，导致 IκB 降解。因此，泛素结合结构域，例如 TAB2 和 TAB3 锌指结构，可能会选择性地识别 K63 多聚泛素链以促进信号转导。

一些小分子可直接控制泛素连接酶的活性。生长素（吲哚-3-乙酸）是一种通过促进大量基因的转录来调节发育的植物激素。然而，生长素不是刺激转录因子，而是加速一些特异的转录抑制子的降解。生长素受体实际上是一种泛素连接酶复合体，它以生长素调节的转录抑制子为靶标从而使这些蛋白水解。F-框蛋白能够解释在植物提取物中所有的生长素结合活性。

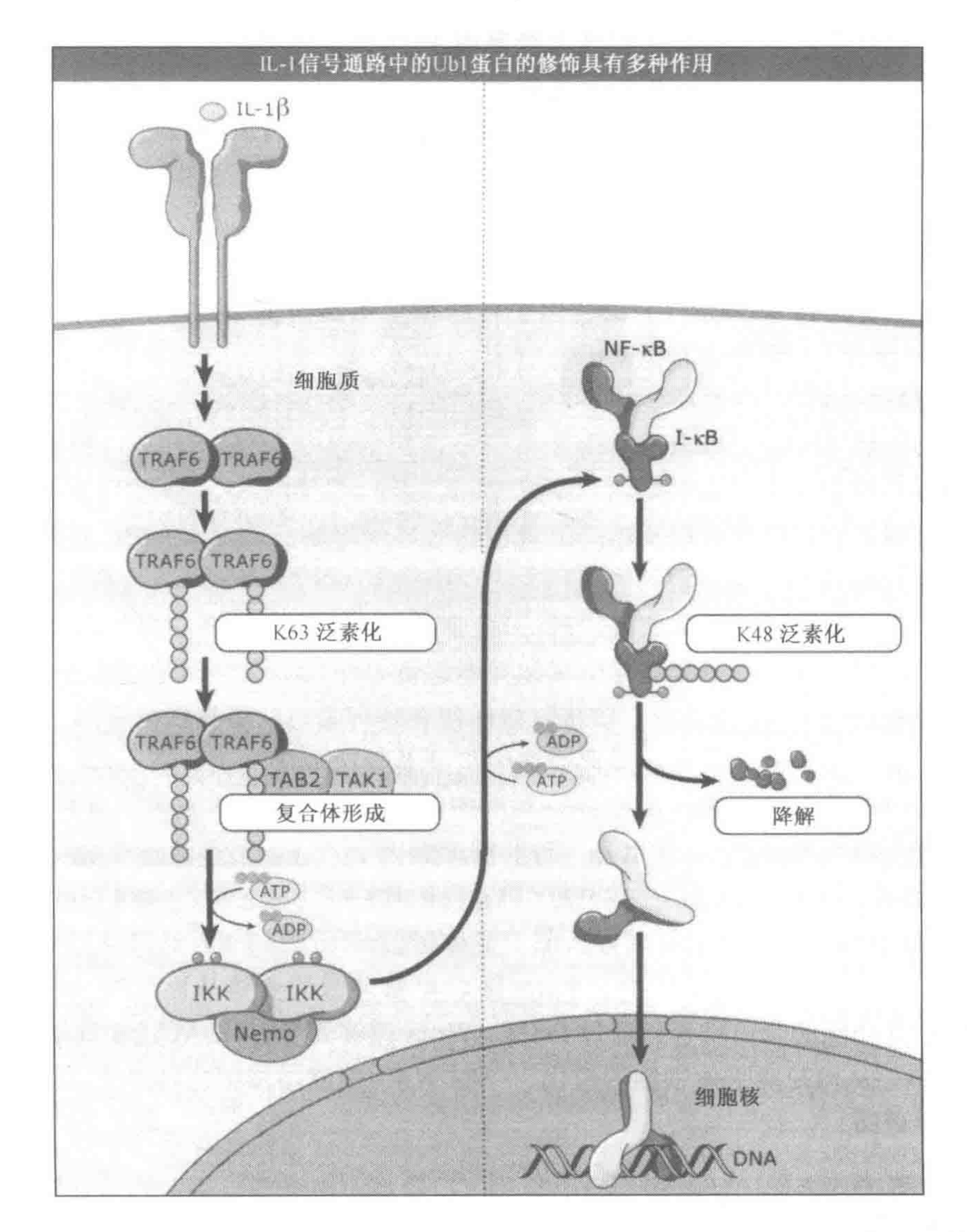


图 14.33 NF-κB 活化包括的步骤：依赖于通过泛素结合蛋白产生的与连接有泛素的蛋白相互作用、通过刺激产生的竞争、磷酸化和泛素介导的蛋白降解。

14.29 Wnt 通路在成体发育和其他过程中对细胞有重要调控作用

关键概念

- 7 次跨膜受体调控复杂的分化过程。
- Wnts 是脂修饰的配体。
- Wnts 信号通过多种不同的受体转导。
- Wnts 阻止了一种多功能转录因子 β-连环蛋白的降解。

Wnt 通路在胚胎发育中以及成体的形态发生、身体结构确定、脊椎形成、增殖和

细胞运动中都具有功能。在很大程度上经典的 Wnt 信号转导机制是通过研究果蝇和爪蟾的发育以及分析癌症中的遗传变异而揭示的。

Wnt 蛋白是罕见的胞外配体。除了碳水化合物，它们含有共价连接的保证其生物活性的棕榈酸酯。Wnts 通过结合多种不同的受体来转导信号。最重要的是七次跨膜受体的 Frizzled 家族的成员。

Wnts 调控 β-连环蛋白的稳定性，β-连环蛋白或者迅速降解或者应答 Wnt 而稳定地进入细胞核，并通过与 TCF（T 细胞因子）的相互作用而诱导转录。诱导的基因包括 C-jun、周期蛋白 D1 和许多其他基因。

蛋白激酶糖原合成酶激酶 3（GSK3）和酪蛋白激酶 1（CK1）、支架蛋白 axin 和腺瘤性结肠息肉病（APC）以及胞质内多条信号通路的衔接因子（DSH）的协同活性对于 β-连环蛋白的稳定性是很重要的。缺乏 Wnt，由 CK1 和 GSK3 介导的 β-连环蛋白的磷酸化，可促进它的泛素化以及随后由蛋白酶介导的降解。axin 和 APC 对 GSK3 介导的 β-连环蛋白的磷酸化是必需的。

与大多数 7 次跨膜的受体相反，Frizzled 家族还未发现由异源三聚体 G 蛋白介导的重要作用，G 蛋白在这条信号通路中可能并不起重要作用。信号转导通路中由 Frizzled 介导的步骤包括与 DSH 的结合，该步骤能够使 β-连环蛋白的降解机制失活。

在多种癌症中普遍存在导致经典通路中组分总量改变的突变。Wnts 和 β-连环蛋白都能被视为原癌基因。例如，APC 是一种肿瘤抑制因子，在大多数人直肠癌中 APC 都发生了突变。axin 和 APC 一样也是一种肿瘤抑制因子，axin 过多或过少会扰乱 Wnt 信号转导。

Wnts 能够利用另外的信号转导机制。受体蛋白质 Lrp5/6（与低密度脂蛋白受体相关）是 Wnt 受体也可与 axin 结合。Wnts 结合酪氨酸激酶受体从而影响轴突导向，还与其他抑制其功能的蛋白结合。通过 DSH，Wnts 能够调节 JNK MAPK 通路和 Rho 家族的 G 蛋白，从而控制平面细胞的极化。一些 Wnts 能够增加胞内钙离子而活化钙依赖的信号转导通路。

14.30 酪氨酸蛋白激酶调控多种信号转导机制

关键概念

- 许多酪氨酸蛋白激酶受体被生长因子活化。
- 酪氨酸蛋白激酶受体的突变可能致癌。
- 配体的结合促进受体寡聚化和自磷酸化。
- 信号转导蛋白结合已活化受体的磷酸化酪氨酸残基。

有一大类酪氨酸蛋白激酶是跨膜并与细胞外配体结合的受体，如图 14.34 所示。这些受体通常被一些具正常生理功能的生长因子所活化，包括促进生长、增殖、发育或维持分化特性。这一类生长因子包括胰岛素、表皮生长因子（EGF）和血小板来源的生长因子（PDGF）。这些受体不仅能控制所有蛋白激酶家族的活性还能直接调节其他类别的信号转导蛋白。

因为酪氨酸激酶受体作为生长调节因子具有生理作用，导致它们活化的突变常常是

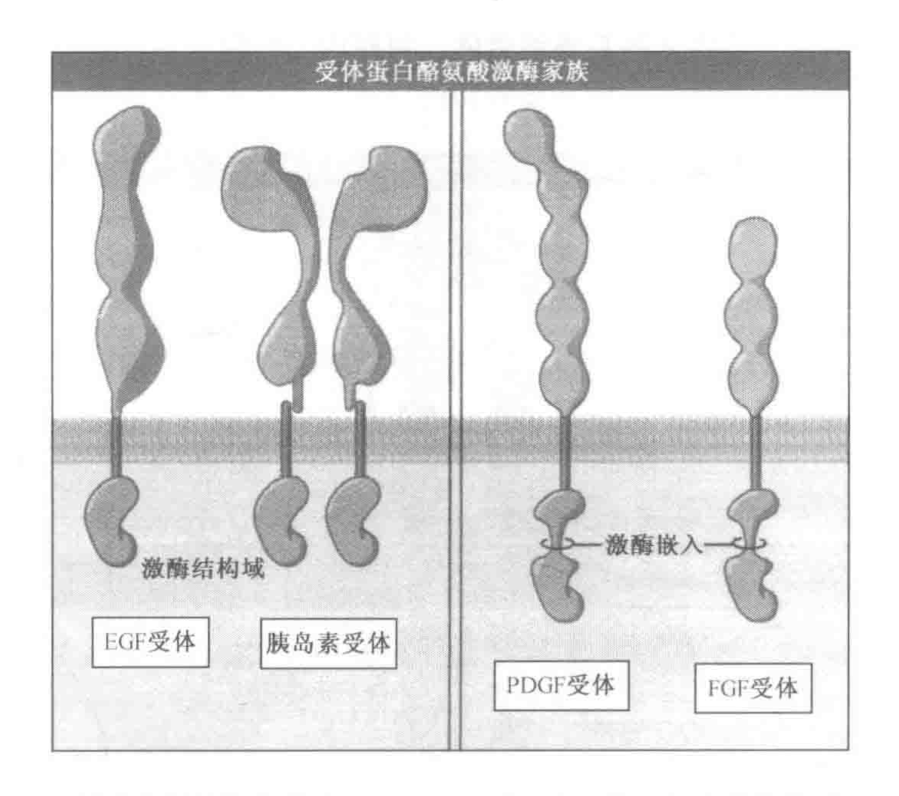


图 14.34 单体酪氨酸激酶受体由一个球状的结合配体的细胞外结构域、一个单次跨膜和一个包含蛋白激酶结构域的球状的细胞内区域组成。至于 PDGF 和 FGF 受体群，细胞内区域包含前后插入蛋白激酶结构域的额外序列。这些区域包括酪氨酸磷酸化依赖性相互作用位点。胰岛素受体是由一个单一基因编码的。前体可被蛋白水解为 α 和 β 亚基，它们彼此结合的二硫化物。二硫键也将两个 α 亚基连在一起，形成一个专性的异源四聚体。

致癌的。例如，癌基因 erbB 就是与 EGF 受体密切相关的激酶胞外配体结合结构域缺失所导致的。这种突变引起蛋白激酶结构域的组成性活化。影响跨膜结构域的点突变也能够引起癌基因活化，如在 EGF 受体相关的 neu/HER2 癌基因中已有发现（见 13.8 生长因子激活细胞的生长和增殖）。

酪氨酸激酶受体不仅胞外配体结合结构域有差异，而且它们的胞内调节区域，除了保守的酪氨酸激酶结构域，也是不同的。这些受体通常为一次跨膜的单体，但是还有些受体，如胰岛素受体由二硫键连接为异二聚体，则是二次跨膜。配体与酪氨酸激酶受体结合使受体寡聚化并增强激酶活性，导致受体胞内结构域和连接分子的酪氨酸磷酸化。这些磷酸化的酪氨酸基序为另外的信号转导子和接头蛋白创建了停泊位点。

PDGF 与胰岛素受体的比较揭示出酪氨酸激酶受体行为的一般特点和范围。PDGF 受体有两种是酪氨酸激酶受体单聚体。胰岛素受体存在两种剪切形式，分别为异四聚体，由两个 α 和两个 β 亚基组成。在每一种形式中，亚型受体采用一些独特的信号转导机制。

PDGF 和胰岛素各自活化它们受体的激酶活性，引起受体的寡聚化和自磷酸化。在 PDGF 受体上有 7 个或更多的位点被磷酸化，并且每一个磷酸化酪氨酸残基形成一个或多个对含有 SH2 结构域的蛋白的结合位点，如图 14.35 所示。PDGF 受体结合 PI-3 激酶、p190 Ras GAP、磷脂酶 C-γ、Src（它可能催化受体另外的酪氨酸磷酸化）以及自身与接头蛋白 Grb2 结合的 SHP2 酪氨酸磷酸化酶（见 14.32 MAPK 是许多信号通路的中枢）。除了 Src 之外，所有这些蛋白都是受体底物。因此，底物 SH2 结构域与受体磷

酸酪氨酸特异性相互作用将底物募集到受体，使胞内一些信号转导因子的活性与定位发生变化。这一系列的信号转导事件在发育和伤口愈合过程中增强了相关组织的增殖。

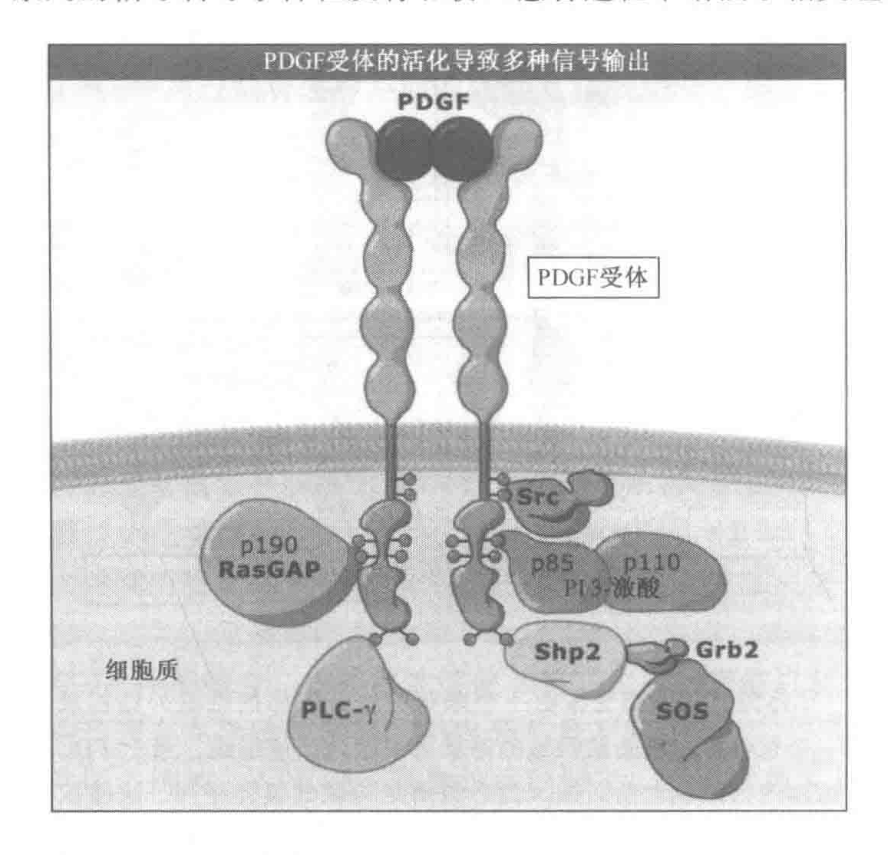


图 14.35 PDGF 同其受体结合并引起受体自磷酸化。自磷酸化的受体会同包含 SH2 结构域的靶蛋白结合。

胰岛素受体自磷酸化可稳定其活化状态，并且形成少量结合位点，如图 14.36 所示。其关键点是胰岛素受体底物蛋白（IRS）尤其是 IRS1，在多达 12 个位点上的酪氨酸磷酸化。在 PDGF 刺激中，IRS1 与一些直接结合到受体上的信号转导效应子相互作用。PI3 激酶引起 AKT-2 活化和胰岛素一些重要代谢活性就是其作用的目标（见 14.16 脂类和脂源性的化合物是信号分子）。IRS 蛋白也是由丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化磷酸化来调节其信号转导的能力。

酪氨酸磷酸化通常会增强与其结合的蛋白的酶活性。其他蛋白功能增强主要是通过它们的 SH2 结构域最大限度地结合受体或者 IRS 接头蛋白上的磷酸化位点。许多酪氨酸激酶受体的精确活性是由多种与之相互作用的信号转导因子确定的，其中包含信号转导因子和接头蛋白所显示的细小差异以及不同的受体表达模式（见图 14.43）。

14.31 Src 家族蛋白激酶与酪氨酸蛋白激酶受体协同作用

关键概念

- 空间内抑制上的释放使 Src 活化。
- Src 的活化涉及模块结合结构域的显露，这一结构域是激活依赖性相互作用所需要的。
- Src 通常与受体结合，包括酪氨酸激酶受体。

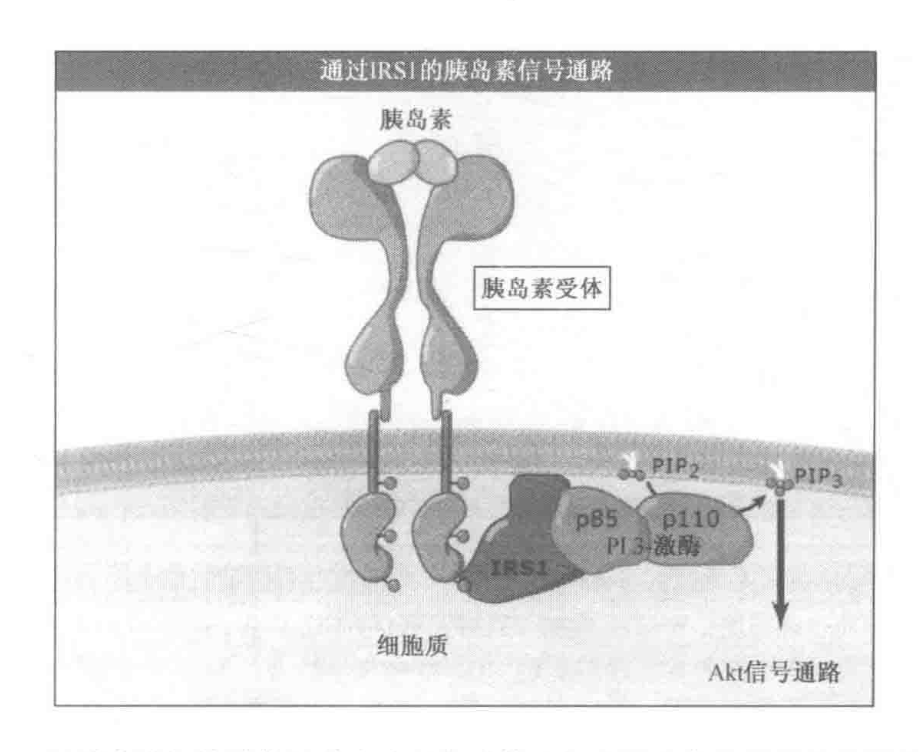


图 14.36　胰岛素与其受体的结合会引起受体酪氨酸蛋白激酶的活化以及自磷酸化。受体激酶也会磷酸化 IRS1，它是一种具有许多潜在磷酸化位点的大接头蛋白。在胰岛素作用中，IRS1 是一种基本介导因子。PI3 会在其 p85 亚基内通过 SH2 结构域同 IRS1 相结合。Akt 和 PDK1 与由 PI3 激酶活化的 PIP3 结合，从而使 PDK1 能够磷酸化并活化 Akt（见图 14.18）。

Src 是第一个被发现的酪氨酸蛋白激酶，它被鉴定为 Rous 肉瘤病毒中的转化体。Src 是许多相关酶（Src 家族激酶）的原始类型。Src 参与由细胞表面受体调节的信号转导通路，包括那些自身缺少激酶结构域的受体（见 14.34 多种受体可将酪氨酸蛋白激酶募集到质膜）。Src 通过一个 N 端肉豆蔻酰基与质膜结合。在钝化状态，Src C 端到催化结构域之间的 Tyr527 位点被 CSK（C 端 Src 激酶）磷酸化。

Src 的结构和调节如图 14.37 所示。Tyr527 的磷酸化使它与自身的 SH2 结构域结合。SH2 和 SH3 结构域通过蛋白表面的相互作用抑制激酶的活性。SH3 结构域会与远离活性位点的 SH3 结合位点相结合。通过 Tyr527 的去磷酸化而活化 Src，并引起其 SH2 的分离；这会导致 SH3 结构域构象改变，从而使它从结合位点分离下来。Src 病毒隔离通常截去 Tyr527 前一段以增强其活性。

激酶结构域 SH3 解离导致的构象改变会促进 Src 活性环上 Tyr416 的自磷酸化，并且进一步增强蛋白激酶的活性。Src 同其自身的 SH2 和 SH3 结构域的相互作用的一个重要结果是，这些结构域在自我抑制状态下不能与其他任何结构域相结合；因此，当 SH2 和 SH3 从它们与 Src 激酶结构域相结合的位点释放后，其他相互作用就会增强。SH2 和 SH3 的异源相互作用可促进 Src 的定位和信号转导。

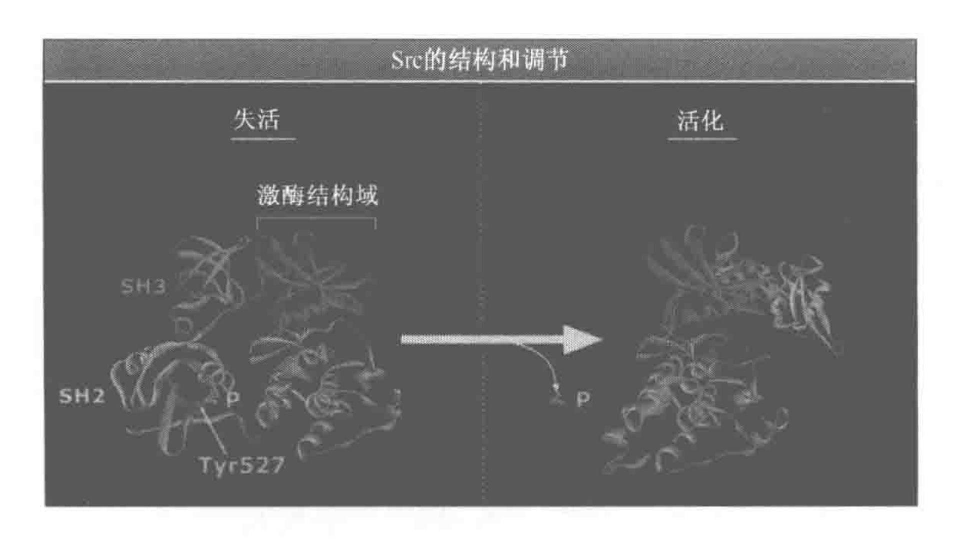


图 14.37 有活性和无活性的 Src 结构的比较。无活性的蛋白通过结合其自身的 SH2 和 SH3 结构域而自我抑制。SH2 结构域与磷酸化的 Tyr527 结合。SH3 结构域则与激酶结构域活性位点相反侧面的一个非经典的 SH3 结合基序结合。与 R 亚基引起的 PKA 空间抑制相反，由 SH2 和 SH3 结构域引起的 Src 抑制是变构的。在活性结构中，SH2 和 SH3 结构域并不与激酶结构域结合，这对异源相互作用是有效的。结构来自 Protein Data Base files 1FMK 和 1Y57。

14.32 MAPK 是许多信号通路的中枢

关键概念

- 酪氨酸和苏氨酸的磷酸化将 MAPK 活化。
- 两个位点磷酸化形成了一个信号转导的阈值。
- ERK1/2 和 MAPK 通路通常由 Ras 调控。

有丝分裂原活化蛋白激酶（MAPK）存在于所有真核细胞中。它们为最常见的多功能蛋白激酶，对许多配体和其刺激作出应答而介导细胞调控事件。MAPK 被至少包含三种蛋白激酶级联激活，如图 14.38 所示。MAPK 的活化是由 MAPK 激酶（MAP2K）催化的，而 MAP2K 自身则是通过 MAPK 激酶的激酶（MAP3K）磷酸化而活化的。MAP3K 是由多个机制活化的，包括 MAP4K 磷酸化、寡聚化以及与小 G 蛋白之类的活化因子相结合。

MAP2K 通过丝氨酸/苏氨酸两个残基上的磷酸化而被活化；然后 MAP2K 通过在酪氨酸和苏氨酸残基上的双重磷酸化将 MAPK 活化（见图 14.30）。每个 MAP2K 磷酸化有限的 MAPK，很少或不磷酸化其他底物。MAP2K 最特异之处是保证 MAPK 不会被不适当的信号激活。为使 MAPK 酶活性达到最大，需要同时将酪氨酸和苏氨酸磷酸化。

对 MAPK ERK2 的研究加深了对磷酸化增大酶活性重要性的理解。构象变化包括改善底物定位的活化环再折叠以及催化残基的重新排列；这在 α 螺旋 C 的重新定位中表现得最为明显，在磷酰基转移因子中 α 螺旋 C 包含一个谷氨酸。

因为 MAP2K 比 MAP3K 丰富得多，级联反应从 MAP3K 进行至 MAP2K 后就会有

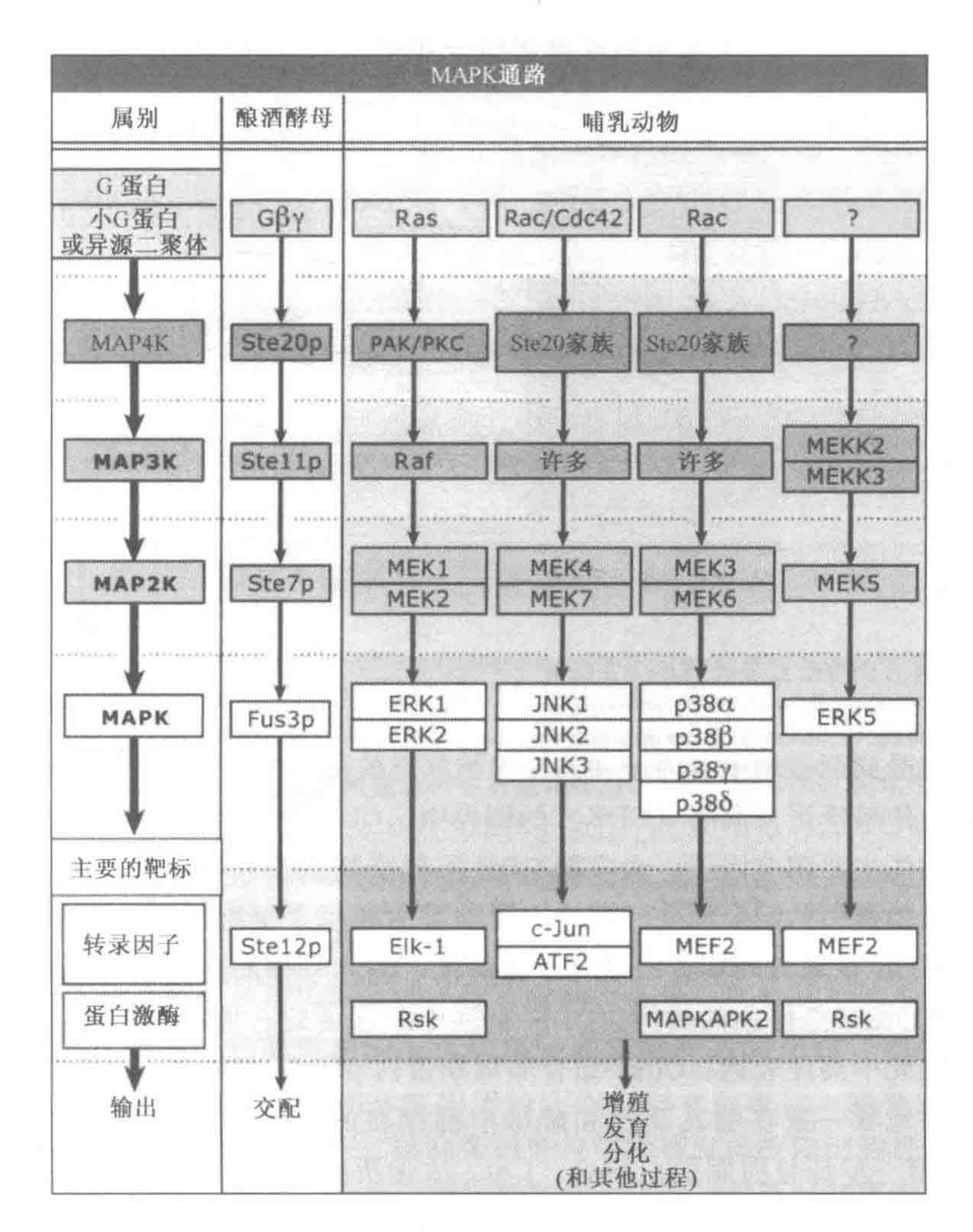


图 14.38　MAPK 通路可以被一群不同的上游调节机制所调控，这些机制通常包括接头蛋白、小 G 蛋白和 MAP4K。这些分子与 MAP3K 活化紧密相关。MAP3K 依赖定位和支架结构调节一种或更多的 MAP2K。MAP2K 对单一的 MAPK 类型表现出很强的选择性。MAPK 具有重叠和独特的底物，并参与导致许多细胞应答的信号转导级联反应。

信号放大。如果 MAPK 比 MAP2K 多，则从 MAP2K 进行到 MAPK 可能也同样有信号放大。此外，MAP2K 在 MAPK 酪氨酸和苏氨酸残基上的磷酸化将 MAPK 协同活化，这是除了已描述的 PKA 和钙调蛋白之外的另一种机制，在多种信号输入的通路中会有一个阈值和明显的协同作用参与其中。这种多步级联为来自其他通路的调节输入信号提供了多个位点。

组分间稳定的相互作用也是很重要的。MAP2K 以及 MAPK 底物和 MAPK 磷酸酶，通常包括一个基本的/疏水性的停泊基序，它与酸性残基相互作用并在 MAPK 催化结构域上的一个疏水沟内结合。另外的包含支架结构的组分对细胞中 MAPK 级联反应的有效活化是必需的，而且通常具有额外的功能。一些支架结构已被确定与三种主要

MAPK 级联反应的每一种中的两种或更多组分相结合，如 ERK1/2、JNK1-3 和 p38α、β、γ 和 δ。

ERK1/2 通路受到大多数细胞表面受体的调控，包括酪氨酸激酶受体、GPCR 和其他受体。PDGF 受体像大多数受体系统一样，能够通过 Ras 活化 ERK1/2 级联反应。PDGF 刺激其受体的自磷酸化以及随后效应子与其胞质结构域的结合（见 14.30 酪氨酸蛋白激酶调控多种信号转导机制）。对 PDGF、ERK1/2 的应答可通过膜上的酶、参与决定细胞形态和运动的蛋白磷酸化，也可以通过在核中的聚集来磷酸化转录调控因子，从而促使细胞增殖和分化。

14.33 周期蛋白依赖性蛋白激酶调控细胞周期

关键概念

- 细胞周期由周期蛋白依赖性蛋白激酶（CDK）调控。
- CDK 的活化涉及蛋白的结合、去磷酸化和磷酸化。

细胞分裂受到刺激增殖的因子和监控细胞状态的信号的正负调控。所有这些因子整合于周期蛋白依赖性蛋白激酶（CDK）的调控中。CDK 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，是细胞周期进程的主要调节因子。大多数 CDK 不仅受到激酶和磷酸酶的调节，还通过与**周期蛋白**及其他蛋白的结合而受到调控。周期蛋白在每个细胞周期中多会合成和降解。因为大多数 CDK 依赖与周期蛋白结合才能活化，因此每种周期蛋白合成和降解的时间决定了一种 CDK 发挥作用的时间。CDK 家族中最显著的非周期成员是 Cdk5，它在终端分化的神经元中高度表达。Cdk5 结合非周期蛋白 p35 作为它的活性亚基。

我们简要地看一看在哺乳动物和酵母中都存在的一种主要的 CDK Cdc2 的调节。Cdc2 调节的第一步是与周期蛋白结合。Cdc2 活化所必需的第二步是通过另外的 CDK 类型激酶将其活性环上的一个苏氨酸残基磷酸化。尽管它与周期蛋白结合，这种形式的 Cdc2 仍然没有活性，这是由于在 ATP 结合点上有酪氨酸和苏氨酸残基的抑制性磷酸化存在。在磷蛋白磷酸酶 Cdc25 家族催化下，通过去磷酸化从而消除抑制，就会导致 Cdc2 的活化。靠近的催化残基的酪氨酸残基如图 14.39 所示。CDK 活化的复杂性使细胞周期检验点调控成为可能。CDK 和周期蛋白的细节见 11.4 细胞周期就是 CDK 的一个活性周期。

14.34 多种受体可将酪氨酸蛋白激酶募集到质膜

关键概念

- 结合酪氨酸蛋白激酶的受体与效应子的作用方式同酪氨酸激酶受体相似。
- 这些受体通常直接结合转录因子。

许多受体通过酪氨酸蛋白激酶发挥作用，但是它们的细胞表面受体缺乏激酶活性。取而代之，这些受体通过募集并活化质膜上的酪氨酸蛋白激酶而发挥作用。整合素属于这类受体，它们包括参与细胞黏附的关键分子、生长激素受体以及介导炎症和免疫应答

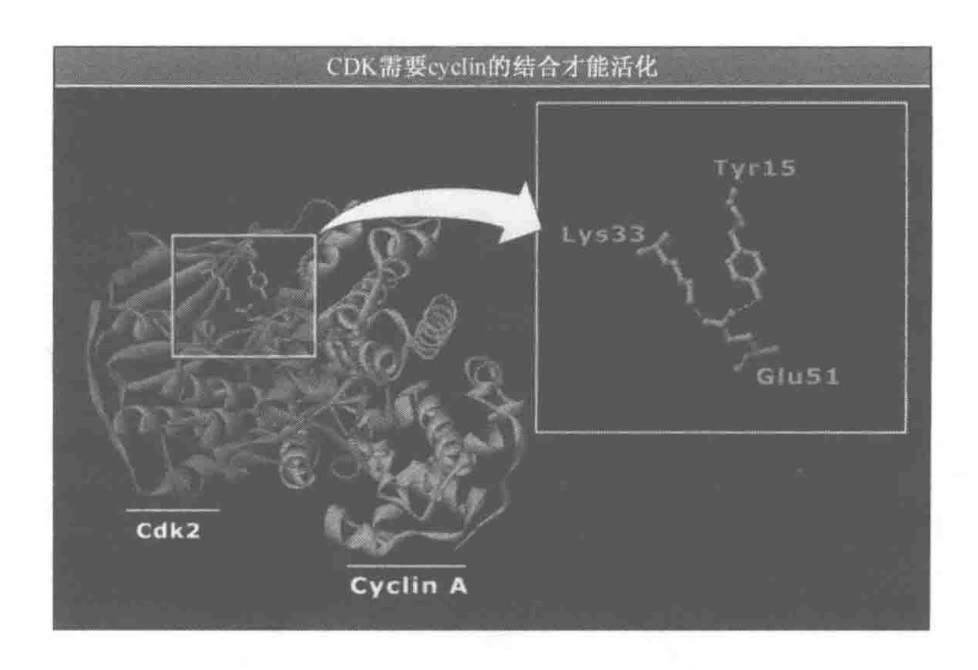


图 14.39　CDK2 结合周期蛋白 A 的晶体结构显示出 ATP 结合位点上的残基。右边的放大显示的是 Lys33 和 Glu51 间的相互作用，它们同 ATP 相互作用从而促使磷酰基转移的催化残基。Tyr15 在 CDK2 钝化形式下被磷酸化。Tyr15 上的磷酰基基团会通过干扰 ATP 结合从而抑制 CDK 活性。结构来自 Protein Data Bank file 1JST。

的受体。它们的结构变化很大，但它们的激活机制却相关。

整联蛋白是细胞与胞外基质相连的受体。它们也介导一些与其他细胞上蛋白的相互作用，如图 14.40 所示。整联蛋白的配体包括一些细胞外基质蛋白，如纤维结合蛋白（fibronectin），以及在细胞-细胞相互作用中协作的细胞表面蛋白。整联蛋白连接为细胞提供了影响细胞行为的环境信息。整联蛋白的连接能够发出控制细胞进程的信号，包括细胞周期起始、增殖、存活、分化、细胞形态变化和运动以及对其他配体有规则的应答。整联蛋白的细节见 15.13 *大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体*和 15.14 *整联蛋白受体参与细胞信号转导*。

踝蛋白（talin）和 α-辅肌动蛋白属于直接与特定的整合素亚基相互作用的细胞骨架蛋白。这些细胞骨架蛋白将整合素和复杂的细胞骨架结构连接起来，如**黏着斑**。

黏着斑将细胞骨架与信号转导级联反应相连接，将细胞附着状态与细胞应答调控的信号相联系。黏着斑复合体包括黏着斑激酶 FAK，它通过整合素连接活化。FAK 的自磷酸化会募集包含 SH2 结构域的信号转导蛋白，尤其是 PI3 激酶的 p85 亚基和 Src 家族蛋白激酶。信号转导分子与整合素连接的细胞骨架蛋白相结合，无论结合的是黏着斑还是其他结构复合体，都会介导不同的整合素激活。细胞骨架蛋白与整合素受体的结合也会引起受体功能上的改变。

远距离作用信号，如激素，也能够通过非受体酪氨酸激酶在细胞内转导它们的信息。生长激素（GH）是由调控骨骼生长、脂肪新陈代谢和其他细胞生长现象的由垂体前叶腺分泌的一种蛋白激素。缺乏生长激素会导致矮小，反之，分泌过多则会导致肢体肥大症，这是巨人症的一种形式。GH 受体是胞内受体家族的一个成员，该家族包括泌乳刺激素受体、促红细胞生成素受体、leptin 受体和白细胞介素受体。所有这些受体都

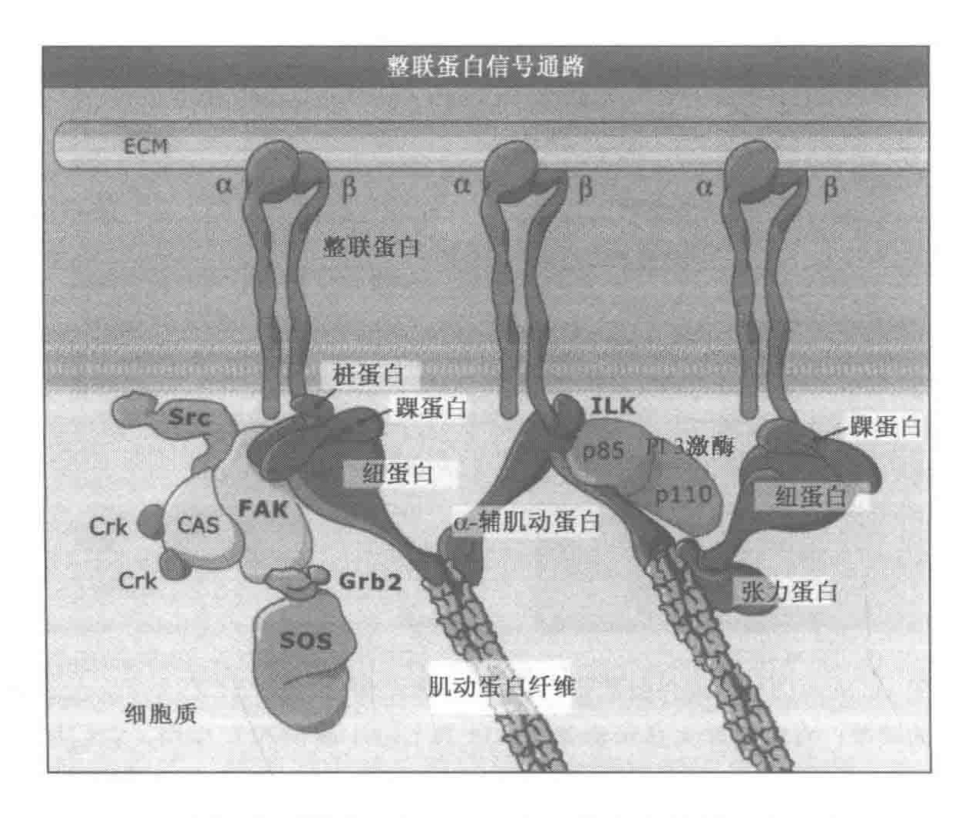


图 14.40 整联蛋白同一群细胞质蛋白相结合来调控细胞骨架和细胞内信号转导通路。相关的细胞骨架元件包括肌动蛋白纤维和黏着斑蛋白 α-辅肌动蛋白、纽蛋白、桩蛋白和踝蛋白。信号分子包括黏着斑激酶 FAK；接头蛋白 Cas、Crk 和 Grb2；Src 和 CSK（见 14.31Src 家族蛋白激酶与酪氨酸蛋白激酶受体协同作用）、PI3 激酶（见 14.16 脂类和脂源性的化合物是信号分子）；还有 Ras 交换因子 SOS。通过 SOS 实现的 Ras 的 GTP 结合会导致 MAPK 通路的活化（见 14.32 MAPK 是许多信号通路的中枢）。

表现出相似的生化功能，如都与酪氨酸蛋白激酶 JAK/TYK 家族成员相结合，但是在一组细胞质信号转导蛋白中选择不同成员，在不同选择中可以有重叠。通过 GH 受体的信号转导为缺乏酶功能的受体提供了一个模型，通过激动剂促进性支架结构将信号传递给细胞内信号转导蛋白。

图 14.41 显示结合到其受体胞外结构域的生长激素结构。大部分结合能量只来自结合界面很少量的残基。在细胞内，通过 GH 受体的信号转导在很大意义上依赖于它与胞质酪氨酸蛋白激酶 Janus 激酶 2（JAK2）的结合。图 14.42 显示 JAK2 同受体富含脯氨酸的区域结合。配体结合可引起受体二聚化作用，随后通过分子间的自磷酸化促进 JAK2 的活化。

因此 GH 信号转导主要是通过诱导酪氨酸磷酸化来介导的。除了 JAK2 的自磷酸化，受体自身也会有酪氨酸磷酸化。的确，对于酪氨酸激酶受体来说，生长激素受体酪氨酸磷酸化产生信号转导蛋白的结合位点，这些蛋白含有磷酸酪氨酸结合结构域。主要的靶标是转录因子，已知的有信号转导因子、转录激活因子或 STAT。STAT 包含 SH2 结构域和结合生长激素受体上磷酸酪氨酸基序。当受体结合时，STAT 通过 JAK2 将酪氨酸磷酸化，随后 STAT 被释放出来进入核中诱导转录变化。

生长激素受体以及与其相联系的 JAK2 也能活化其他信号转导通路。例如，接头蛋白 Shc 通过 JAK2 将酪氨酸磷酸化。Shc 的连接作用会导致 Ras 和 ERK1/2 MAPK 通

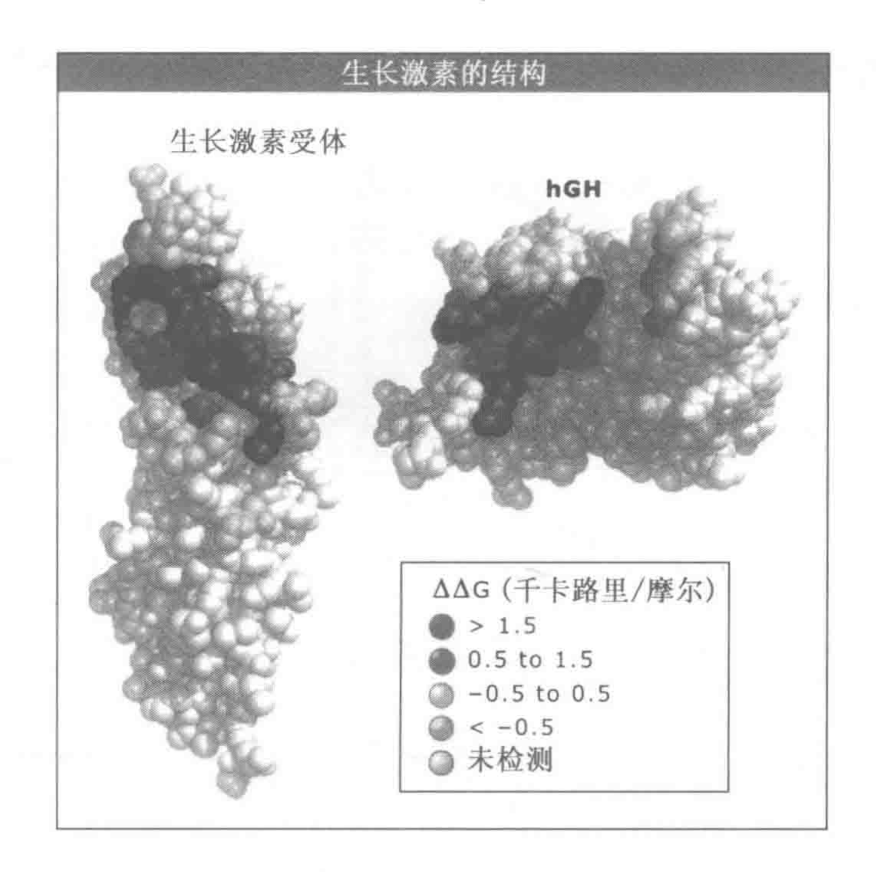


图 14.41 蛋白经常在一个巨大的表面范围内相互作用。生长激素与其受体结合就是一个例子，结合的能量主要来自两种蛋白间少量的接触，形成了一个相互作用热点。在这张图中，根据晶体衍射，同生长激素受体结合结构域结合的生长激素复合体被分开，显示出通过遗传突变和结合研究确定的与每种蛋白结合界面上的残基相关的结合能量。不足一半的界面上的残基能够促进大部分的结合能量。经许可复制自 T. Clackson and J. A. Wells. 1995. *Science*. 267：383-386. © AAAS. 照片由 ARIAD Pharmaceuticals 公司的 Tim Clackson 惠赠。

路的活化。胰岛素信号转导通路的专一性接头蛋白，胰岛素受体底物（IRS）1，2 和 3 是生长激素靶标，这也许反映出生长激素诱导特定胰岛素样代谢作用的能力。

反馈路线也参与 GH 信号转导过程。生长激素受体复合体结合到接头蛋白 SH2-B，SH2-B 对生长激素信号转导有刺激作用。另一方面，细胞信号转导的抑制因子（SOCS 蛋白）属于转录受生长激素诱导的基因之列。顾名思义，SOCS 蛋白至少在某些情况下通过抑制 JAK2 的活性抑制细胞因子信号转导。SOCS 蛋白包含一个促进其与磷酸化的 JAK2 结合或与细胞因子受体结合的 SH2 结构域。在 SOCS 蛋白间信号转导抑制的机制可能是不同的，因为有一些需要 GH 受体来干扰 JAK2 信号转导。另一方面，SOCS-1 直接与 JAK2 活性环相结合，而且不需要受体来抑制 JAK2 的活性。这种机制可能在 GH 信号转导中尤为重要，因为与配体诱导的控制许多受体的调控机制对比，GH 受体以一种非配体依赖性的方式降解。

细胞因子受体也通过募集酪氨酸激酶来发挥作用。细胞因子——调节炎症以及细胞生长和分化的信号转导蛋白——包括白细胞介素、白血病抑制因子、制瘤素（oncostatin）M、心肌营养素-1、心肌营养素样细胞因子和纤毛神经营养因子（CNTF）。每种细胞因子都结合一种独特的受体，但是每种受体都结合一种称为 gp130 的跨膜蛋白。

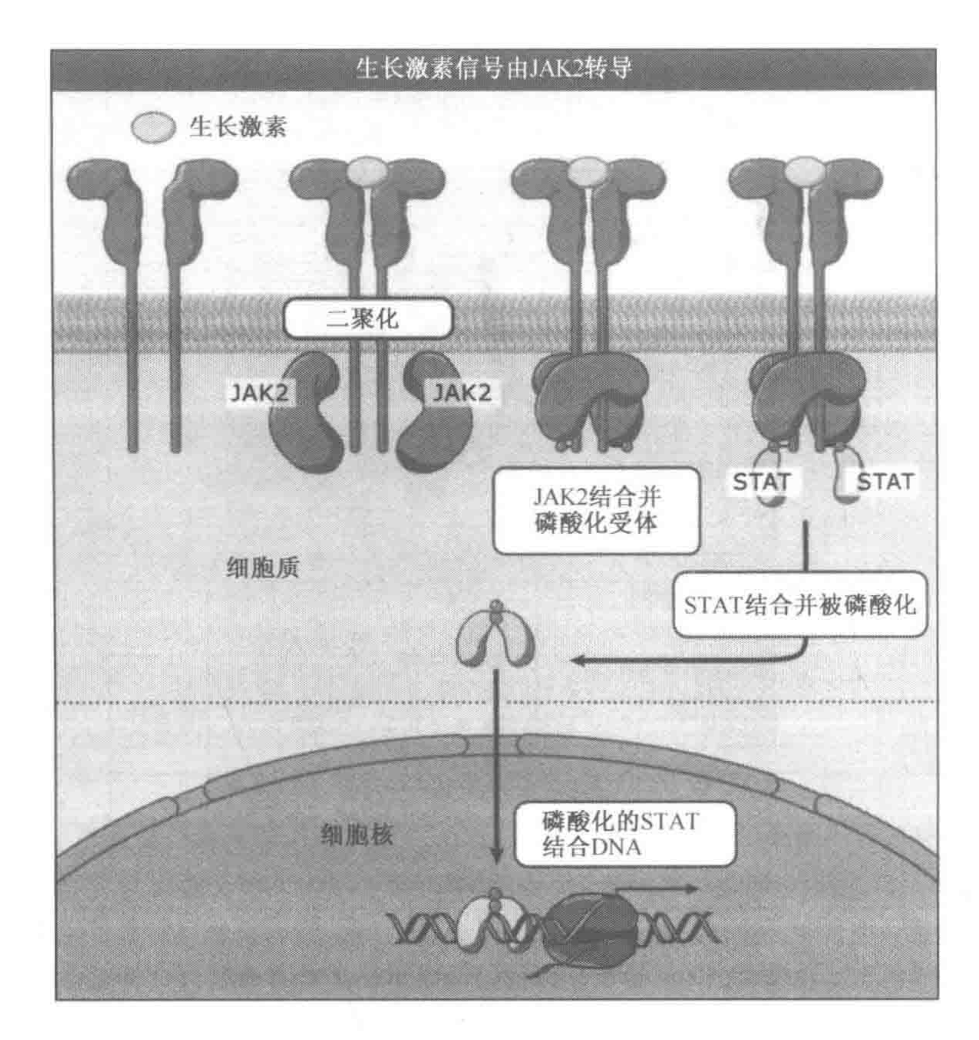


图 14.42　生长激素受体结合 JAK2。许多 GH 信号是通过 JAK2 的受体酪氨酸磷酸化介导的，它形成了对带有 SH2 结构域，特别是 STAT 的信号分子的结合位点。STAT 随后进入核从而引起基因转录上的改变。

gp130 参与的信号转导机制包括 JAK/TYK 型酪氨酸激酶和 STAT 家族中的转录因子的相互作用。这种机制同生长激素受体的相似。

与此类中的许多细胞因子受体不同，CNTF 受体自身并不是跨膜蛋白。而是连接在质膜外表面的**葡糖基磷脂酰肌醇（GPI）**。GPI 连接是一种共价键，受体能够通过一种特异的磷酸酶被释放到细胞外基质中。这种游离的受体可以和其他细胞的膜相互作用来诱导信号。

通用信号转导亚基 gp130 的使用，表明存在独特机制来形成配体特异性应答；在某些情况下，为了与 gp130 信号转导子相互作用，配体结合亚基的竞争可能会影响信号转导输出。图 14.43 阐明了在通过相联系的受体或特定的蛋白激酶起始的信号转导通路中的某些平行关系。

我们讨论的最后一种受体类型将提出特异和通用亚基概念。复杂的多蛋白 T 细胞受体（TCR）只在 T 淋巴细胞中发现，并且它是这些细胞能够识别并对特异性抗原应答的原因。TCR 如图 14.44 所示，由 8 个亚基组成，它也可以被描述为是 4 个二聚体 αβ、γε、δε 和 ζζ 装配在一起。抗原识别的特异性是由 α 和 β 亚基确定的，而这一点对于每种细胞又是不同的。在 TCR 中保留的亚基是不变的。

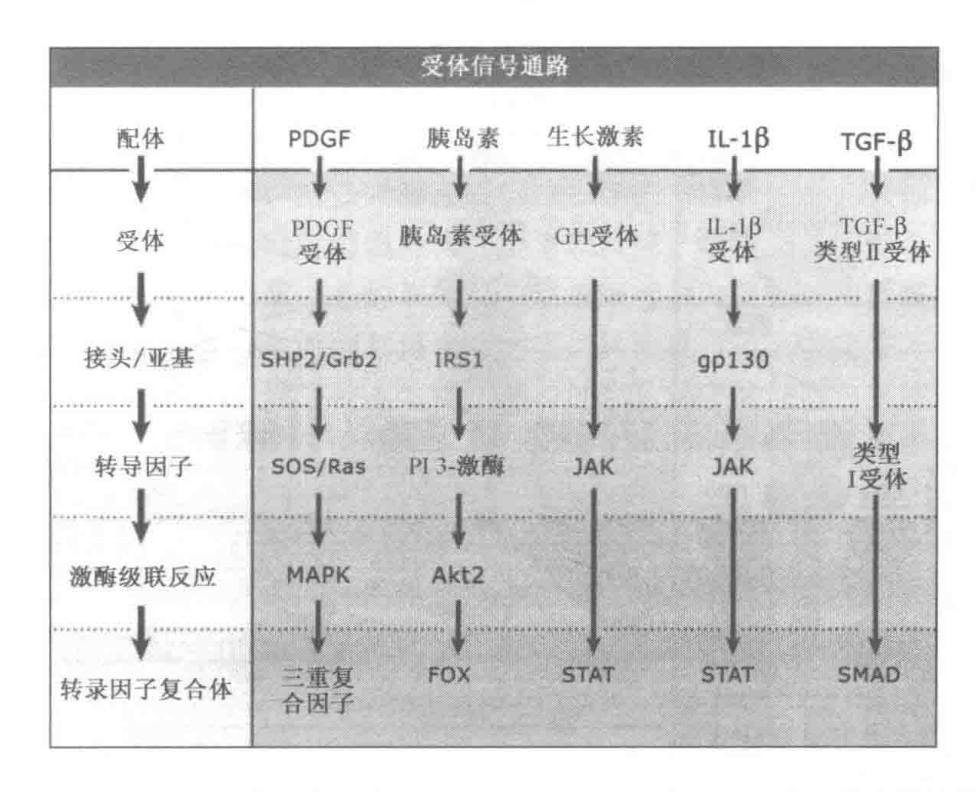


图 14.43　由 PDGF、胰岛素、TGF-β、IL-1β 和生长激素调控的主要的信号转导级联反应的比较。每种受体或者包含或者与一种转导因子相互作用或能够募集一种转导因子的蛋白激酶相互作用。这种转导因子能够调节下游的效应子，或者是直接的，或者是通过一种中间的蛋白激酶级联反应。这里显示的效应子是转录调控因子。通过转导因子或激酶级联的磷酸化能够活化所有的效应子，除了 FOXO 蛋白，它们可能通过磷酸化被排除到细胞核外。此表只显示了由这些配体调控的复杂得多的信号转导网络的简单描述。例如，IRS 蛋白也能够促进生长激素和 IL-1β 的信号转导，而 MAPK 通路受到所有这些配体的调控。

CD3 复合体 γ、δ 和 ε 亚基在序列上彼此相似。ζ 链与其他链不同，出现在某些确定的细胞类型中，可能是其他受体的一个组分，如与某些免疫球蛋白的一部分相结合的 Fc 受体。

基于酪氨酸活化的免疫受体基序或者以空间上紧靠酪氨酸残基对为特征的 ITAM，是通过 TCR 转导信号的关键。每个 CD3 亚基包括一个 ITAM 和含有三个 ITAM 的 ζ 链，在每个 TCR 中共有 10 个基序。TCR 的接合会引起 Src 家族激酶 Lck 和 Fyn 磷酸化 ITAM 中的酪氨酸残基对。随后 ITAM 会结合到酪氨酸蛋白激酶 ζ 链成串的 SH2 结构域上，由 Src 活化的 ζ 链结合蛋白 70kDa（ZAP-70）能与此结构域结合。ZAP-70 上的酪氨酸磷酸化位点可与其他接头蛋白和信号转导分子结合，通过 ZAP-70 的酪氨酸磷酸化活化其他的信号转导因子。这些事件的整合导致 T 细胞结合抗原后的下游应答，包括细胞周期进程以及细胞因子如白细胞介素-2 的产生。

14.35　展望

新的信号转导蛋白和新的调节性相互作用似乎每天都有发现。目前的挑战是认识细胞如何组织这些蛋白以及每个蛋白的相互作用最终连接成信息传递网络。细胞如何利用简单的化学反应分选和整合多种刺激输入信号，并接着将信息引入不同的效应子？它们

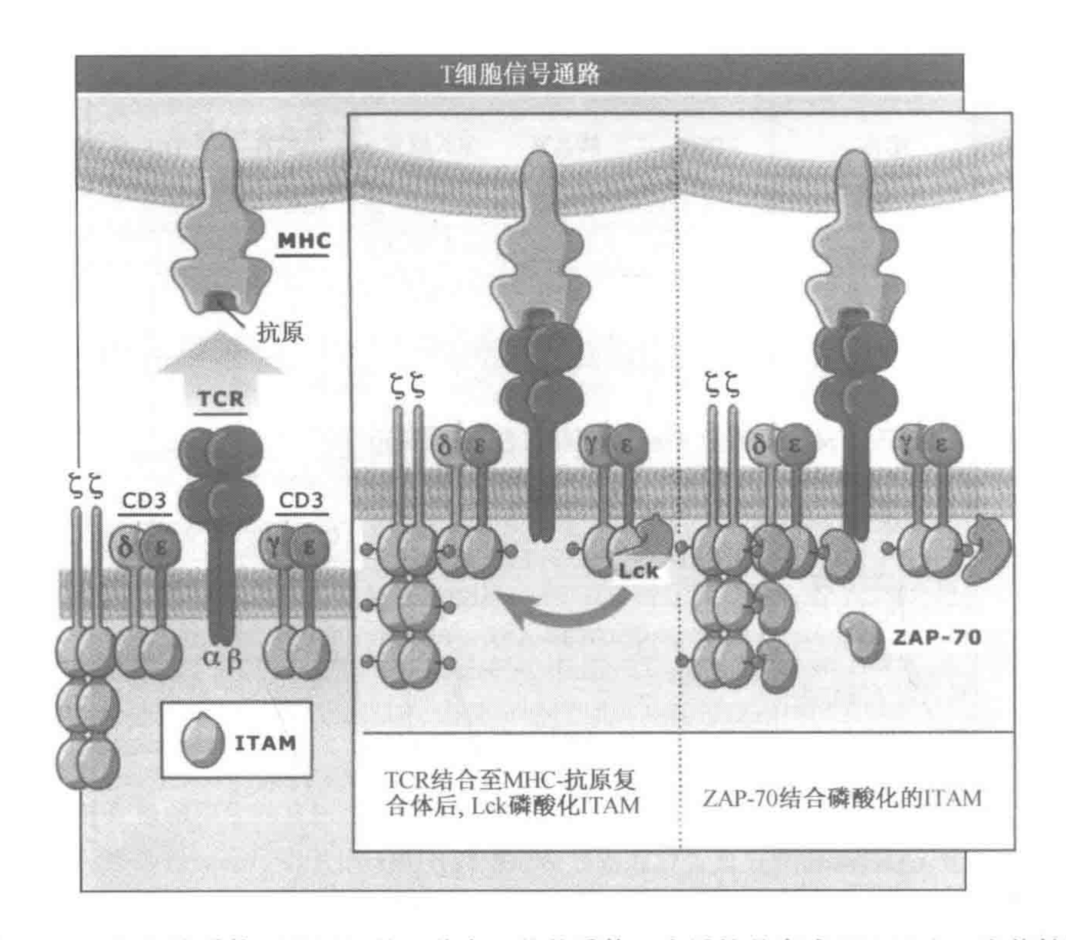


图 14.44　T 细胞受体（TCR）是一种多亚基的受体。在活性基序或 ITAM 上，它能够被 Lck 或一种相关的 Src 家族蛋白激酶磷酸化。磷酸化的残基形成了对另外的酪氨酸蛋白激酶 ZAP-70 的结合位点。ZAP-70 随后会募集其他信号转导分子来到包含磷脂酶 Cγ、PI3 激酶和一种 Ras 交换因子的复合体，从而活化下游的信号转导通路。

如何在其生长和代谢活动中整合输入信号？大体上，三个领域的研究促进我们了解整体的细胞信号转导。

首先，我们需要实时、无干扰的生物传感器来检测细胞内信号转导反应。当前大多数的感应器是通过将荧光基团和信号结合蛋白结构域联合提供快速的光学装置。对许多通路而言，一些反应在细胞内能够以亚秒水平被监控。我们需要更多、更好且更快的感应器，需要能够在单个细胞和亚细胞分辨水平上记录的感应器。遗传上编码的感应器将会通过合成的分子得到补充。

我们操纵信号转导网络的能力有了巨大的进步，但仍是不足的。我们可以通过基因的过表达、敲除和下调来操纵信号转导网络，但是信号转导通路具有惊人的适应性，常常绕过我们试图控制它们的最大努力。我们仍然需要能够在细胞中迅速发挥作用的化学调节子。在结构基础上设计的调节性分子将是很有必要的。

最后，我们分析信号转导网络行为的能力依赖于我们定量检测和解释信号转导的能力。没有它们如何作用的精确量化模型，就不能描述出真正复杂的系统。计算模型和信号转导网络刺激既需要更好的网络动力学的理论认识，也需要更好系统的建立。

我们的目的是要弄清楚细胞是如何思考的。

14.36 总结

信号转导包含所有细胞感受其周围环境中的刺激及作出应答反应的机制。细胞表达识别细胞外特异刺激的受体，这些刺激包括营养、激素、神经递质和其他细胞。通过受体的结合，信号被转换为明确的细胞内化学或物理反应，这些反应能够改变细胞内蛋白复合体的活性和组成。由刺激引起的改变将导致细胞行为的变化。随后细胞行为通过其细胞内状态和来自细胞外刺激的信息整合来确定，从而进行适当的应答。

在整个生物界中信号转导的基本生化组分和过程是保守的。蛋白家族通过各种作用方式达到许多不同的生理目的。细胞经常通过一系列相同的信号转导蛋白来调节多个过程，如转录、离子运输、运动和新陈代谢。

信号转导通路组合成信号转导网络，从而使细胞将多种输入信号的应答与其功能相协调。现在已有可能辨别信号转导网络通路中和通路间保守的反应程序，信号转导网络类似于模拟计算机线路中的装置：放大器、逻辑门、反馈和前馈控制及其记忆。

参考文献

14.1 导言

综述

Sauro, H. M., and Kholodenko, B. N., 2004. Quantitative analysis of signaling networks. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* v. 86 p. 5–43.

研究

Milo, R., Shen-Orr, S., Itzkovitz, S., Kashtan, N., Chklovskii, D., and Alon, U., 2002. Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* v. 298 p. 824–827.

14.2 细胞信号转导基本上为化学反应

综述

Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D., and Pugh, E. N., Jr., 2002. G proteins and phototransduction. *Annu. Rev. Physiol.* v. 64 p. 153–187.

Caterina, M. J., and Julius, D., 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 24 p. 487–517.

Gillespie, P. G., and Cyr, J. L., 2004. Myosin-1c, the hair cell's adaptation motor. *Annu. Rev. Physiol.* v. 66 p. 521–545.

Lin, C., and Shalitin, D., 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* v. 54 p. 469–496.

Rockwell, N. C., Su, Y.-S., and Lagarias, J.C., 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biology,* v. 57 p. 837–858.

Sancar, A., 2000. Cryptochrome: The second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annu. Rev. Biochem.* v. 69 p. 31–67.

14.3 受体感受各种的刺激源于有限的细胞信号组成成分

研究

Klein, C., Paul, J. I., Sauvé, K., Schmidt, M. M., Arcangeli, L., Ransom, J., Trueheart, J., Manfredi, J. P., Broach, J. R., and Murphy, A. J., 1998. Identification of surrogate agonists for the human FPRL-1 receptor by autocrine selection in yeast. *Nat. Biotechnol.* v. 16 p. 1334–1337.

14.5 配体的结合改变了受体的构象

综述

Ross, E. M., and Kenakin, T. P., 2001. Pharmacodynamics: Mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effects. In *Goodman and Gilmans's The Pharmacological Basis of Therapeutics,* 10th Ed., J. G. Hardman and L. E. Limbird, eds., New York: McGraw-Hill, p. 31–43.

14.6 在信号转导通路和网络中，信号被分类和整合

研究

Itzkovitz, S., Milo, R., Kashtan, N., Ziv, G., and Alon, U., 2003. Subgraphs in random networks. *Phys. Rev. E.* v. 68 p. 126–127.

14.7 细胞信号转导通路可被认为是一系列的生化反应

综述

Milo, R., Shen-Orr, S., Itzkovitz, S., Kashtan, N., Chklovskii, D., and Alon, U., 2002. Network motifs: Simple building blocks of complex networks. *Science* v. 298 p. 824–827.

研究

Torres, E., and Rosen, M. K., 2003. Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol. Cell* v. 11 p. 1215–1227.

14.8 支架结构增加了信号转导效率同时增强了信号转导的空间定位特异性

综述

Elion, E. A., 2001. The Ste5p scaffold. *J. Cell Sci.* v. 114 p. 3967–3978.

Kholodenko, B. N., 2003. Four-dimensional organization of protein kinase signaling cascades: The roles of diffusion, endocytosis and molecular motors. *J. Exp. Biol.* v. 206 p. 2073–2082.

O'Rourke, S. M., Herskowitz, I., and O'Shea, E. K., 2002. Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.* v. 18 p. 405–412.

Pawson, T. and Nash, P., 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* v. 300 p. 445–452.

Tsunoda, S., and Zuker, C. S., 1999. The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in Drosophila photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium* v. 26 p. 165–171.

研究

Levchenko, A., Bruck, J., and Sternberg, P. W., 2000. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 5818–5823.

Rensland, H., Lautwein, A., Wittinghofer, A., and Goody, R. S., 1991. Is there a rate-limiting step before GTP cleavage by H-ras p21? *Biochemistry* v. 30 p. 11181–11185.

Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C. G., and Spiegel, A. M., 1991. The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *J. Biol. Chem.* v. 266 p. 9309–9313.

14.9 独立的模块结构域决定蛋白质-蛋白质相互作用

综述

Pawson, T., and Nash, P., 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* v. 300 p. 445–452.

Turk, B. E., and Cantley, L. C., 2003. Peptide libraries: At the crossroads of proteomics and bioinformatics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 7 p. 84–90.

研究

Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A., Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., and Greenberg, M. E., 1993. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* v. 260 p. 238–241.

14.10 细胞信号具有显著适应性

综述

Perkins, J. P., Hausdorff, W. P., and Lefkowitz, R. J., 1990. Mechanisms of ligand-induced desensitization of β-adrenergic receptors. In *The Beta-Adrenergic Receptors*, J. P. Perkins, ed., Clifton, NJ: Humana Press, p. 73–124.

14.11 信号转导蛋白经常多样化表达

综述

Barnes, N. M., and Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* v. 38 p. 1083–1152.

Gilman, A. G., 1987. G proteins: Transducers of receptor-generated signals *Annu. Rev. Biochem.* v. 56 p. 615–649.

Rebecchi, M. J., and Pentyala, S. N., 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* v. 80 p. 1291–1335.

Sunahara, R. K., and Taussig, R., 2002. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: Multiplicities of signaling. *Mol. Interventions* v. 2 p. 168–184.

14.14 第二信使为信息转导提供了便捷的途径

综述

Beavo, J. A., Bechtel, P. J., and Krebs, E. G., 1975. Mechanisms of control for cAMP-dependent protein kinase from skeletal muscle. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* v. 5 p. 241–251.

Kobe, B., Heierhorst, J., and Kemp, B. E.,

1997. Intrasteric regulation of protein kinases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* v. 31 p. 29–40.
Wong, W., and Scott, J. D., 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 959–970.

研究
Rall, T. W, and Sutherland, E. W., 1958. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* v. 232 p. 1065–1076.

14.15 所有真核细胞中钙离子信号都具有多种作用

综述
Newton, A. C., 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* v. 101 p. 2353–2364.

研究
Clapperton, J. A., Martin, S. R., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., and Bayley, P. M., 2002. Structure of the complex of calmodulin with the target sequence of calmodulin dependent protein kinase I: Studies of the kinase activation mechanism. *Biochemistry*. v. 41 p. 14669–14679.
Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., Bax, A., 1995. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* v. 2 p. 768–776.

14.16 脂类和脂源性的化合物是信号分子

综述
Rebecchi, M. J., and Pentyala, S. N., 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* v. 80 p. 1291–1335.
Yang, C., and Kazanietz, M. G., 2003. Divergence and complexities in DAG signaling: Looking beyond PKC. *Trends Pharmacol. Sci.* v. 24 p. 602–608.

14.17 PI_3激酶调节细胞形态与基本生长及代谢的活化

综述
Downward, J., 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 177–182.
Lawlor, M. A., and Alessi, D. R., 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* v. 114 p. 2903–2910.
Van Haastert, P. J. and Devreotes, P. N. 2004. Chemotaxis: Signaling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5. p. 626–634.

14.18 通过离子通道受体的信号转导非常迅速

综述
Clapham, D. E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* v. 426 p. 517–524.
Corey, D. P., 2003. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron* v. 39 p. 585–588.
Hille, B., 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
Siegelbaum, S. A., and Koester, J., 2000. Ion channels and Membrane potential. In *Principles of Neural Science*, 4th Ed., E. R. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell, eds., New York: McGraw-Hill. p. 105–139.

研究
Unwin, N., 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J. Mol. Biol.* v. 346 p. 967.

14.19 核受体调节转录

综述
Mangelsdorf, D. J., et al., 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* v. 83 p. 835–839.
Smith, C. L. and O'Malley, B. W., 2004. Coregulator function: A key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.* v. 25 p. 45–71.

研究
Brzozowski A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Green, G. L., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M., 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* v. 389 p. 753–758.

14.20 G蛋白信号转导模块被广泛使用与高度适应

综述
Clapham, D. E., and Neer, E. J., 1997. G protein βγ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 37 p. 167–203.
Filipek, S., Teller, D. C., Palczewski, K., and Stenkamp, R., 2003. The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 32 p. 375–397.
Ross, E. M., and Wilkie, T. M., 2000. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: Regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu.*

Rev. Biochem. v. 69 p. 795–827.
Ross, E. M., 1989. Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. *Neuron* v. 3 p. 141–152.
Sprang, S. R., 1997. G proteins, effectors and GAPs: Structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 7 p. 849–856.
Sprang, S. R., 1997. G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* v. 66 p. 639–678.

研究

Benke, T., Motoshima, C. A., Fox, H., Le Trong, B. A., Teller, I., Okada, D. C., Stenkamp, T., Yamamoto, R. E., and Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* v. 289 p. 739–745.
Chen, C.-K., Burns, M. E., He, W., Wensel, T. G., Baylor, D. A., and Simon, M. I., 2000. Slowed recovery of rod photoresponse in mice lacking the GTPase acceleration protein RGS9-1. *Nature*, v. 403 p. 557–560.
Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke , C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* v. 289 p. 739–745.
Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R., 1995. The structure of the G protein heterotrimer $G_{i\alpha1}\beta_1\gamma_2$. *Cell* v. 83 p. 1047–1058.

14.23 小的单体GTP结合蛋白是多用开关

综述

Bishop, A. L., and Hall, A., 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* v. 348 pt. 2 p. 241–255.
Kuersten, S., Ohno, M., and Mattaj, I. W., 2001. Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol.* v. 11 p. 497–503.
Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T., 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* v. 81 p. 153–208.

14.24 蛋白磷酸化/去磷酸化是细胞中的一个主要调控机制

综述

Cohen, S., 1983. The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* v. 51 p. 1787–1791.
Fischer, E. H., 1997. "Protein phosphorylation and cellular regulation, II," in *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1991–1995*, N., Ringertz, Ed., Singapore: World Scientific Publishing Co.
Krebs, G., 1993. Protein phosphorylation and cellular regulation. *Bioscience Reports* v. 13 p. 127–142.
Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* v. 298 p. 1912–1934.
Newton, A. C., 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* v. 370 p. 361–371.
Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G., 2004. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell* v. 15 p. 661–675.
Turk, B. E., and Cantley, L. C., 2003. Peptide libraries: At the crossroads of proteomics and bioinformatics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 7 p. 84–90.

研究

Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J., 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* v. 90 p. 859–869.
Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A., Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., and Greenberg, M. E., 1993. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* v. 260 p. 238–241.
Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M., 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* v. 253 p. 407–414.
Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E., and Hunter, T., 1995. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* v. 9 p. 1255–1266.
Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J., 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* v. 367 p. 704–711.

14.25 双向蛋白磷酸化系统是信号转导的中转装置

综述

Hoch, J. A., and Silhavy, T. J., eds., 1995. Two-component signal transduction. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N., 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* v. 69

p. 183–215.

14.26 蛋白激酶的药物抑制剂可用于研究和治疗疾病

综述

Blume-Jensen, P., and Hunter, T., 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* v. 411 p. 355–365.

Cherry, M., and Williams, D. H., 2004. Recent kinase and kinase inhibitor X-ray structures: mechanisms of inhibition and selectivity insights. *Curr. Med. Chem.* v. 11 p. 663–673.

Cohen, P., 2002. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 1 p. 309–315.

Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* v. 351 p. 95–105.

Tibes, R., Trent, J., and Kurzrock, R., 2005. Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 45 p. 357–384.

14.27 磷蛋白磷酸酶与蛋白激酶作用相反并受到单独调控

综述

Aramburu, J., Heitman, J., and Crabtree, G. R., 2004. Calcineurin: A central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep.* v. 5 p. 343–348.

Dounay, A. B., and Forsyth, C. J., 2002. Okadaic acid: The archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor. *Curr. Med. Chem.* v. 9 p. 1939–1980.

Neel, B. G., Gu, H., and Pao, L., 2003. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* v. 28 p. 284–293.

Neely, K. E., and Piwnica-Worms, H., 2003. Cdc25A regulation: To destroy or not to destroy—is that the only question? *Cell Cycle* v. 2 p. 455–457.

Olson, E. N., and Williams, R. S., 2000. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* v. 22 p. 510–519.

Virshup, D. M., 2000. Protein phosphatase 2A: A panoply of enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 12 p. 180–185.

研究

Sun, H., et al. 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo *Cell* v. 75 p. 487–493.

Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T., and Dominguez, R., 2004. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* v. 429 p. 780–784.

14.28 泛素和泛素样蛋白引起的共价修饰是调控蛋白功能的另一种途径

综述

Gill, G., 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* v. 18 p. 2046–2059.

Pickart, C. M. and Eddins, M. J., 2004. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1695 p. 55–72.

研究

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M., 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* v. 435 p. 441–445.

Kanayama, A. et al. 2004. TAB2 and TAB3 activate the NF-κB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell* v. 15 p. 535–548

Kepinski, S., and Leyser, O., 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* v. 435 p. 446–451.

14.29 Wnt通路在成体发育和其他过程中对细胞有重要调控作用

综述

Logan, C. Y., and Nusse, R., 2004. The WNT signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* v. 20, p. 781–810.

Tolwinski, N. S., Wieschaus, E., 2004. Rethinking WNT signaling. *Trends Genet.* v. 20 p. 177–81.

14.30 酪氨酸蛋白激酶调控多种信号转导机制

综述

Birge, R. B., Knudsen, B. S., Besser, D., and Hanafusa, H., 1996. SH2 and SH3-containing adaptor proteins: Redundant or independent mediators of intracellular signal transduction. *Genes Cells* v. 1 p. 595–613.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T., 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* v. 411 p. 355–365.

Cohen, P., 2002. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 1 p. 309–315.

Pawson, T., and Nash, P., 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* v. 300 p. 445–452.

Tallquist, M., and Kazlauskas, A., 2004. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* v. 15 p. 205–213.

Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., and Kahn, C. R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 7, p. 85–96.

14.31 Src家族蛋白激酶与酪氨酸蛋白激酶受体协同作用

综述

Boggon, T. J., and Eck, M. J., 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* v. 23 p. 7918–7927.

Frame, M. C., 2004. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J. Cell Sci.* v. 117 p. 989–998.

研究

Cowan-Jacob, S. W., Frendrich, G., Manley, P. W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., and Meyer, T, 2005. The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation *Structure* v. 13 p. 861–871.

Xu, W., Harrison, S. C., and Eck, M. J., 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* v. 385 p. 595–602.

14.32 MAPK是许多信号通路的中枢

综述

Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H., 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* v. 101 p. 2449–2476.

Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G., 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* v. 74 p. 49–139.

Morrison, D. K. and Davis, R. J., 2003. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 19 p. 91–118.

Sharrocks, A. D., Yang, S. H., and Galanis, A., 2000. Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.* v. 25 p. 448–453.

研究

Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., and Sturgill, T. W., 1990. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* v. 343 p. 651–653.

14.33 周期蛋白依赖性蛋白激酶调控细胞周期

综述

Dorée, M. and Hunt, T., 2002. From Cdc2 to Cdk1: Wwhen did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J. Cell Sci.* v. 115 p. 2461–2464.

Hartwell, L. H., 1991. Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics* v. 129 p. 975–980.

Neely, K. E., and Piwnica-Worms, H., 2003. Cdc25A regulation: To destroy or not to destroy—is that the only question? *Cell Cycle* v. 2 p. 455–457.

Nurse, P., 2000. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* v. 100 p. 71–78.

研究

Pavletich, N. P., 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: Structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* v. 287 p. 821–828.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P., 1996. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* v. 3 p. 696–700.

14.34 多种受体可将酪氨酸蛋白激酶募集到质膜

综述

Ernst, M., and Jenkins, B. J., 2004. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet.* v. 20 p. 23–32.

Herrington, J., and Carter-Su, C., 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* v. 12 p. 252–257.

Levy, D. E,. and Darnell, J. E., 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 651–662.

Miranti, C. K., and Brugge, J. S., 2002. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* v. 4 p. E83–E90.

Palacios, E. H., and Weiss, A., 2004. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* v. 23 p. 7990–8000.

研究

Clackson, T., and Wells, J. A., 1995. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* v. 267 p. 383–386.

桑建利　译

第 15 章 细胞外基质和细胞粘连

George Plopper
Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY

本章概要

15.1 导言

关键概念

- 细胞间连接是特化的蛋白复合体，使相邻的细胞彼此粘连、彼此交流。
- 细胞外基质是细胞间致密的蛋白质网状，是由网络中的细胞产生的。
- 细胞表达胞外基质的受体。
- 胞外基质蛋白和细胞连接控制着组织中细胞的三维结构，以及这些细胞的生长、移动、形状和分化。

地球上生命进化最重要的事件之一就是多细胞生物的出现。一旦细胞建立起一种组合方式，它们就能形成一个整体，其中不同的细胞进化产生特定的功能应答它们面临的各种问题。例如，如果两个单细胞生物发生“会师”，它们中的每一方就会在一些成功生长与繁殖的功能上发生特化，而把其余功能交给另一方。

为了形成简单的多细胞生物或更复杂生物中的组织，细胞必须牢固地彼此粘连。对动物细胞来说，这种粘连可以三种方式完成，如图 15.1 所示。首先，细胞通过**胞间连接**直接彼此粘连，胞间连接是相邻细胞表面特异化的修饰。这些连接部位在电子显微镜下可观察到。其次，细胞可以不形成这些特化部位，利用蛋白质以非连接的方式相互作用。第三，细胞结合到胞间区域里的**细胞外基质（ECM）**网络分子上，形成间接粘连；这一粘连是通过细胞表面与胞外基质的连接实现的。

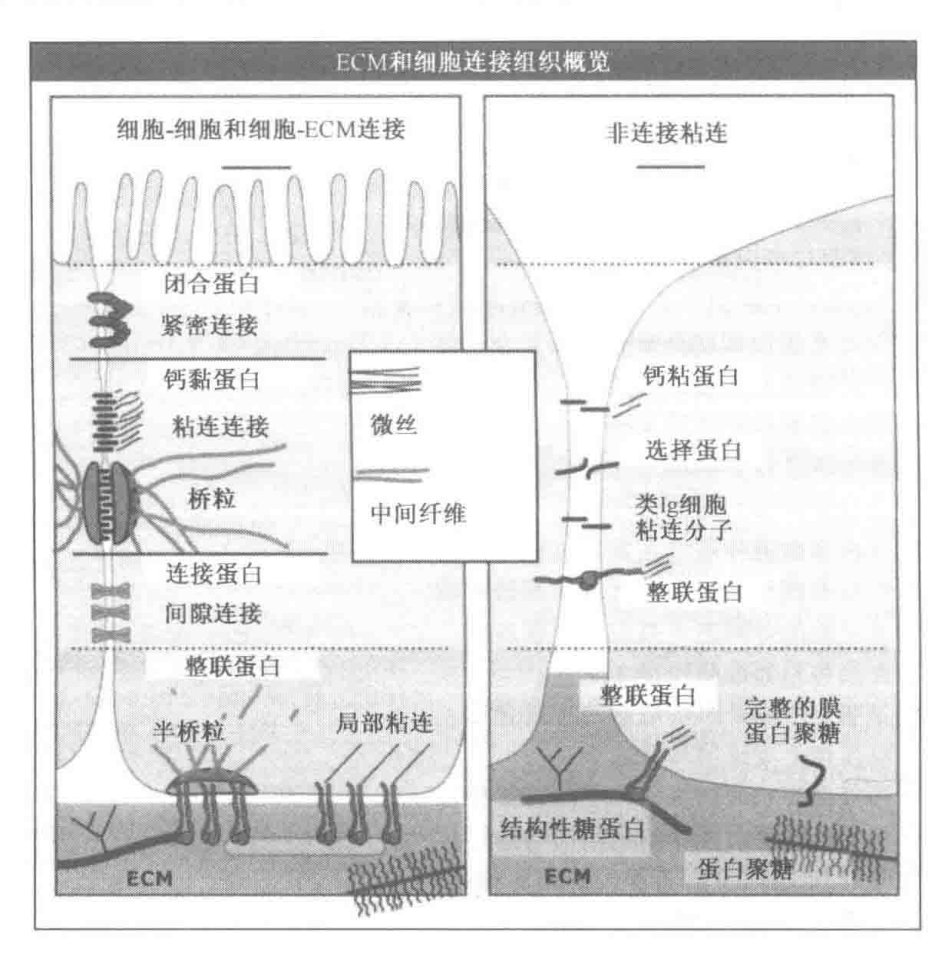


图 15.1　上皮细胞间连接的概括图示（左），非上皮细胞间粘连（右），细胞外基质复合体（底部），此图显示主要类型的细胞外基质成分。

然而，形成一个多细胞生物不是简单地将几个细胞粘连在一起。细胞团队高效运转需要有效的交流和劳动分工。细胞间连接是高度特化的区域，膜结合的蛋白复合体连接着相邻的细胞。存在着几种不同类型的细胞间连接，每一种在胞间联系和交流中都有特殊的作用（见图 15.1）。间隙连接中的蛋白通过形成能让小分子直接穿过的通道，而使相邻细胞间直接通讯交流。形成紧密连结的蛋白是控制分子通过细胞层的选择性屏障，也是质膜蛋白扩散的屏障。粘连连接和桥粒通过连接相邻细胞的骨架而影响机械强度，因此一层细胞能作为一个单元发挥功能。这些连接都能作为信号传感器，将细胞表

面黏合的变化转换成生化信号，传播到细胞的其他部分。

还有几种不同类型的蛋白能介导非连接粘连（见图 15.1），这些蛋白的实例是整联蛋白、钙黏蛋白、选择蛋白以及免疫球蛋白相关的细胞粘连分子。

所有的细胞，甚至最原始的单细胞生物，都有一些传感以及与外部环境相互作用的方式。甚至在多细胞生物进化之前，细胞就能够粘连或穿过它们接触的表面。因此，细胞基质粘连结构的出现是细胞进化过程中最早的事件之一。多细胞生物中，细胞间空间充满高浓度的蛋白质和糖，这些物质称为细胞外基质，如图 15.2 所示。细胞外基质可以形成纤维、层状和片状结构。在一些组织中，细胞外基质形成复杂的片状称为基底膜，与细胞层直接相互作用。组成细胞外基质的蛋白质可以分为两类：一类是结构糖蛋白，如胶原蛋白、弹性蛋白，另一类是蛋白多糖（黏蛋白）。这些蛋白共同影响组织的强度和柔韧性，并作为选择性过滤器控制细胞间颗粒（不溶解）物质的流动。蛋白多糖还能吸水，因此维持细胞周围的水化环境。当细胞迁移时，细胞外基质作为支架供细胞穿行。

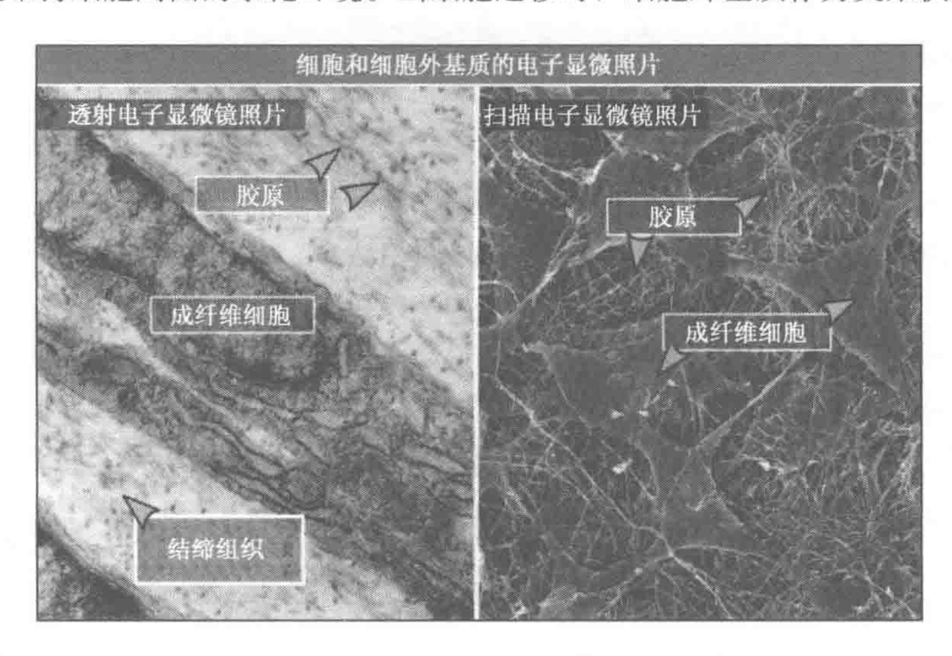


图 15.2 电子显微图显示细胞间空间充满纤维状物质。这些图显示连接组织（左）和角膜（右）成纤维细胞胞外空间的胶原纤维。照片得到 William Bloom 博士和 Don W. Fawcett 博士的许可。左图从 *A Textbook in Histology*，1986 复制，照片（右）由 Ehime 大学医学院的 Junzo Desaki 惠赠。

细胞分泌胞外基质分子。细胞基本上建立了自己的外部支持网络，根据需要通过降解、替代周围的基质对其进行修整。胞外基质组装和降解的控制目前引起人们很大的兴趣，因为这在发育和很多病理阶段，如创伤愈合和癌症上都有重要作用。

细胞外基质连接是细胞表面受体蛋白聚集成斑，连接了质膜外的胞外基质和胞质面的细胞骨架（见图 15.1）。正如一些细胞间的连接，某些蛋白形成高度有序的复合体，连接细胞表面和细胞骨架。这些蛋白远不只是“细胞吸力杯”，它们也参与很多信号过程，使细胞彼此交流。

各种各样的细胞和它们的胞外基质能形成高度特化的稳定组织。一些组织，如软骨、骨和一些结缔组织能够抵抗巨大的机械压力，而另一些如肺部的气囊，脆弱但极度柔韧。强度、韧性和三维复杂性之间的平衡会受到严密的调控，从而使每种组织的成分

作为一个整体发挥特化的功能。因此，组织的成分和结构都与其所在器官的功能相适应；肌肉看起来和皮肤迥然不同是有着充分道理的！

细胞间粘连和细胞外基质连接不仅仅在细胞表面发挥功能。在很多情况下，蛋白必须以充足的强度粘连锚定在细胞膜上，以抵抗机械压力。这就要求它们必须连接到细胞骨架，细胞骨架能为细胞提供主要的结构支持。细胞骨架也能防止膜上受体的侧向移动，将它们锚定在特定位置。除此之外，细胞信号通路也能调控这些连接的组装和维持。细胞骨架和细胞信号在细胞粘连中具有重要的作用。

本章分为几个部分，依次论述细胞外基质分子的主要分类、细胞外基质受体的整联蛋白类型、这些受体在发育过程中的作用以及最常见细胞连接的结构和功能。

15.2 细胞外基质研究简史

关键概念

- 细胞外基质和细胞连接的研究可以根据技术的进步和对结构细节的了解分为四个历史时期。
- 当前对于这一领域的研究主要集中在确定细胞外基质中的蛋白和细胞连接如何控制细胞行为。

对细胞外基质和细胞连接的研究如同细胞生物学研究的许多领域一样，呈现四个历史时期，如图 15.3 所示。第一个时期始于 17 世纪中期，显微镜的发明有力地解决了单细胞的问题。更高级技术的发展使亚细胞结构清晰可见，生物学家开始注意细胞表面和内部的复杂性。与细胞理论的发展相一致，生物学家开始关注细胞在复杂生物发育过程中的中心作用。生物学家也开始在结构水平理解组织中细胞形状、大小、排列的多样性。19 世纪中叶，诞生了一个崭新的生物学亚学科，这就是组织学，主要关注多细胞生物组织的细微结构（通常叫超微结构）。

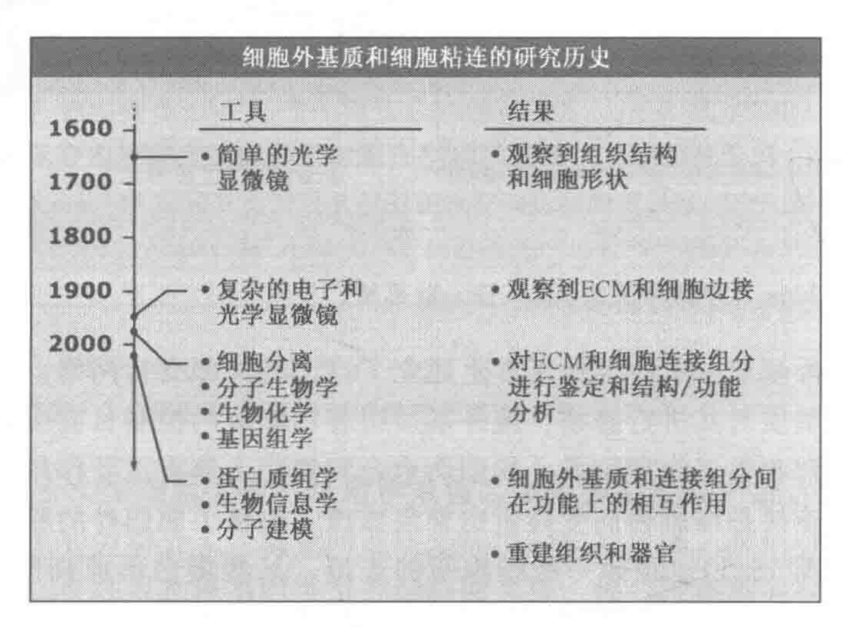


图 15.3 在组织学上细胞外基质和细胞连接的研究进展随着新研究方法和技术的应用而大大加快。

但在组织结构的构成中似乎缺少了些什么：细胞间的空间是什么？显微镜下最明

显的以及难以看见而被忽视的结构成为研究的重点。大多数组织中，细胞间的空间在日常光学显微镜下是暗淡无定形的。早期的组织学课本一点都没有提起这一空间。

第二个时期始于 20 世纪中叶，这时发明了更强大的光学显微镜和电子显微镜。光学显微镜观察组织学染色时发现了充满液体的胞外空间，如图 15.4 所示。电子显微镜显示了这一空间物质的网状结构，如图 15.2 所示。而且，清楚地发现细胞在其表面形成特化的连接，连接的成分与胞外物质以及这些成分之间均彼此相互作用（见图 15.44）。由细胞、流体和这些细胞外物质组成的组织最终得到认可。这一部分结构物质也得名细胞外基质。但显微镜不能显示细胞外基质的成分。

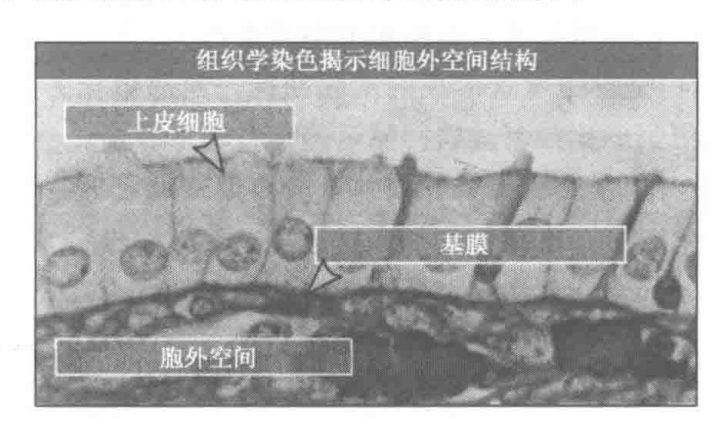


图 15.4 组织学染色使显微镜能够显示多细胞结构的组织特征。这张图展示了组织学染色下的上皮组织，显示了细胞形状和上皮组织层中的排列。照片得到 William Bloom 博士和 Don W. Fawcett 博士的许可，从 *A Textbook in Histology*，1986 复制。

第三个时期开始于 20 世纪 70 年代，大量的新技术被发明出来可以对细胞成分进行分离、鉴定。这些新技术在生物化学、遗传学、分子生物学和显微学上都被应用到细胞生物学的问题当中，使新的发现的速度大大加快。例如，DNA 测序方法的快速发展使研究者破译了几个物种的全基因组，因此我们现在很快就能鉴别这些生物中的每个基因。

利用这些技术识别了组成细胞外基质和胞间连接的上百种蛋白后，我们现在面临下一个大的问题：这些蛋白的功能是什么？现在普遍接受这样的观点：细胞外基质不仅仅决定组织中细胞的三维排列，也控制着这些组织中每个细胞的生长、迁移、分化和协作。将细胞彼此相连的那些特化连接是这些功能的关键调控者。这一领域研究的首要问题目前指向了对这些功能潜在的分子机制的探究，这是细胞外基质和胞间连接研究的第四个时期。我们在本章中将会探讨一些组织处理的方法。

15.3 胶原蛋白支撑着组织结构

关键概念

- 胶原蛋白的主要功能是为组织提供结构支持。
- 胶原蛋白是一个总共包含 20 多种细胞外基质蛋白的家族，是动物界中最丰富的蛋白质。
- 所有的胶原蛋白都是三联螺旋，卷曲成螺管的“胶原蛋白亚基”由三种分离的胶原多肽组成。
- 胶原蛋白亚基由细胞分泌到胞外空间，进而组装成大的原纤维和纤维。
- 胶原蛋白基因的突变会导致多种疾病，从轻度皱纹到脆性骨质再到致死性的皮肤起疱。

胶原蛋白家族包括 20 多种动物界中最丰富的蛋白。胶原蛋白存在于多细胞动物中至少有 5 亿年的历史。几乎所有的动物细胞都合成或分泌一种胶原蛋白。

胶原蛋白为组织提供结构支持，在不同的结构中形态大不相同。胶原蛋白家族中所有蛋白有一个共同的特点：它们捆成一个纤细的（直径近似 1.5nm）三联螺旋，由三个胶原蛋白亚基构成的卷曲螺管，由非共价键和共价键共同维持。

卷曲螺管形成三种胶原结构：纤维结构、片状结构和纤维相关结构，如图 15.5 所示：

- 纤维状的胶原蛋白中，卷曲螺管组织成纤维或“绳状”，沿着单轴线提供巨大的强度（这类似于用金属线成束形成强大的电缆）。当这些原纤维集成平行束，比如腱，它们产生巨大的强度，能够抵抗来自骨骼肌的强大牵拉。

- 片状的胶原蛋白是卷曲螺管形成的网状结构，对肌肉拉力的抗性要小一些，但抗多方向的拉伸能力更强。比如，这些网状结构存在于皮肤中。

- 第三种胶原蛋白是“纤维相关”型，形成的卷曲螺管能将纤维状的胶原蛋白结合在一起。

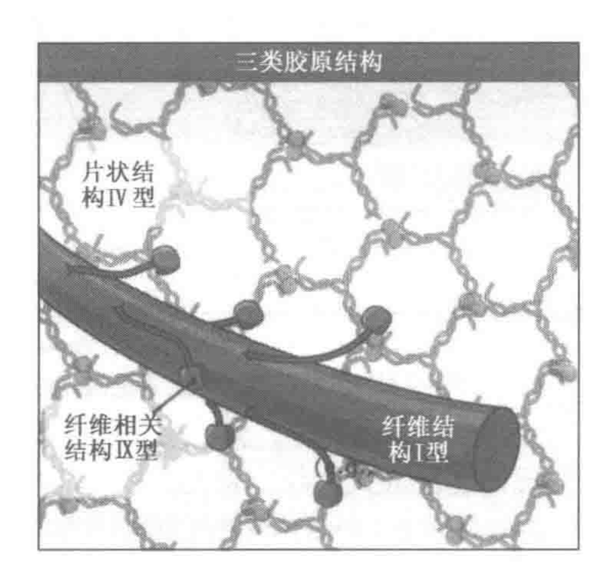


图 15.5 胶原蛋白亚基组装成三螺旋的卷曲螺管，这种螺管可以组装成原纤维状或有其他细胞外基质蛋白加入的片状，包括原纤维相关的胶原蛋白。

不管如何排列，纤维蛋白在细胞外基质中形成了主要的结构支架。其他的细胞外基质蛋白，如纤维结合蛋白（纤连蛋白）和玻璃粘连蛋白，都结合到胶原蛋白上，编织到由胶原蛋白骨架建立的不同结构中去（见 15.4 纤连蛋白将细胞与成胶原基质相连和 15.7 玻璃粘连蛋白在凝血过程中促进靶细胞的黏着）。胶原蛋白家族还有一个成员是一种作为细胞连接的成分的跨膜蛋白（见 15.20 半桥粒连接上皮细胞和基底膜）。

不同类型的胶原蛋白大概有 20 种，其中大多可以分为四类，如图 15.6 所示。每种三螺旋结构用一个罗马数字表示类型（如Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ等）。每个胶原蛋白亚基都称为 α 亚基，亚基的类型由数字表示（如 α1、α2、α3 等），加上其后的表示类型的罗马数字。例如，最重要的纤维状胶原蛋白最初发现于大鼠尾部（和其他组织），命名为Ⅰ型胶原蛋白，由两拷贝的 α1（Ⅰ）和一拷贝的 α2（Ⅰ）组成。

胶原纤维的结构如图 15.7 所示，三个多肽亚基平行缠绕形成 300nm 长的卷曲螺管。胶原蛋白包含特征性的氨基酸重复序列：甘氨酸-X-Y，其中 X 和 Y 可以是任意

胶原的主要种类		
类别	举例	定位
形成纤维（纤维状）	[α1（Ⅰ）$_2$α2（Ⅰ）]	骨，角膜，内脏，韧带，皮肤，腱
纤维相关	α1（Ⅸ）α2（Ⅸ）α3（Ⅸ）	软骨
形成网络	[α1（Ⅳ）]$_2$α2（Ⅳ）	基膜
跨膜	[α（ⅩⅦ）]$_3$	半桥粒

图 15.6　胶原蛋白可以根据它们的分子式、聚合形式和组织分布分成四种主要类型。一些类型包括几种胶原蛋白。

氨基酸，但通常分别是脯氨酸和羟脯氨酸。这一序列使得三个亚基能紧密缠绕，促进卷曲螺线管的形成。这些 300nm 长的单位通过一个单位的 N 端和一个相邻单位的 C 端形成的共价键结合在一起。卷曲螺管平行排列，中间带有小沟（64～67nm）。这些沟为原纤维提供了特征条纹，在电子显微镜下清晰可见。

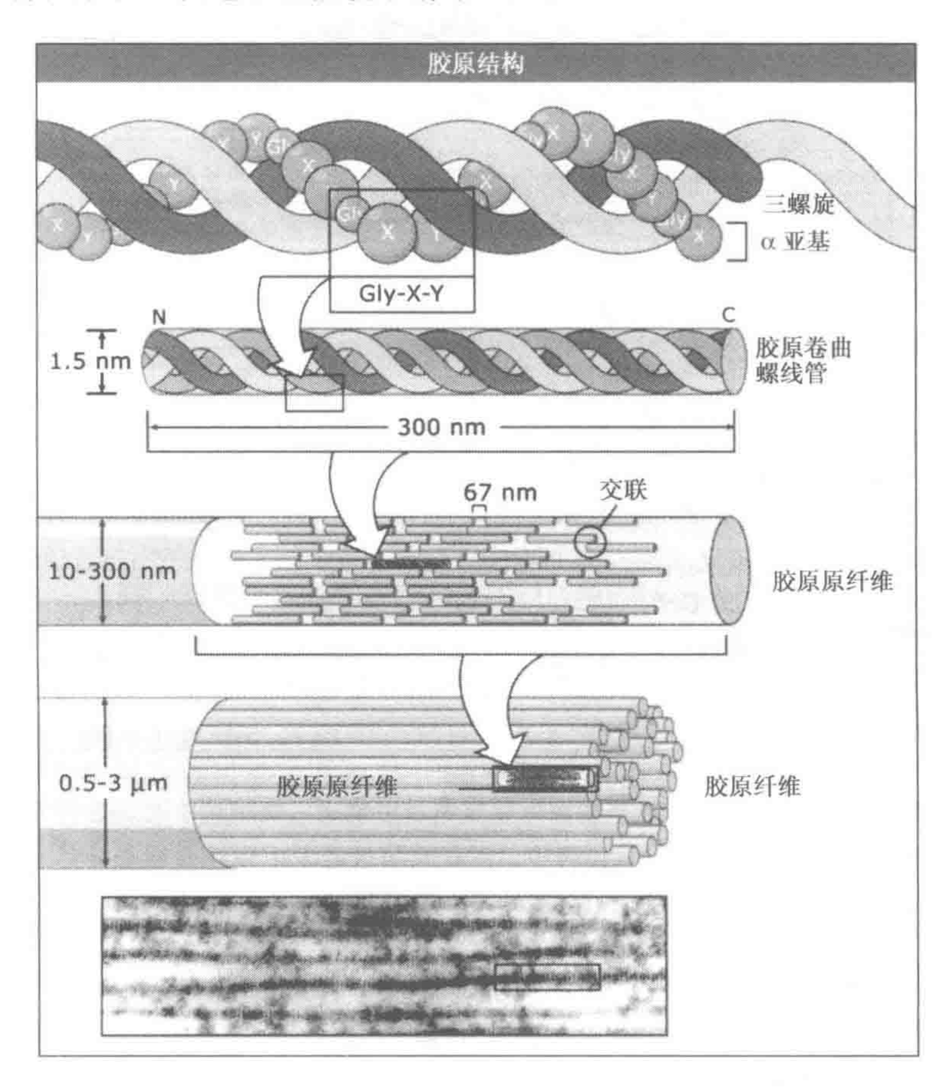


图 15.7　胶原蛋白三螺旋卷曲螺管的图示（顶部）纤维内卷曲螺管的排列（中）胶原纤维中的纤维（底部）。相邻卷曲螺管中 67nm 的沟导致组成纤维的原纤维上带有条纹。照片由 Robert Wood Johnson 医学院的 Robert L. Trelstad 惠赠。

完全组装的胶原蛋白结构，不论是纤维还是片层，都比合成它们的细胞大得多，一些纤维能有几毫米长。因此，胶原蛋白亚基以卷曲螺管的形式合成与分泌，最后的组装步骤发生在细胞外。胶原蛋白的合成和加工是沿着分泌通路进行的，如图 15.8 所示。合成过程中，胶原蛋白通过信号识别颗粒和相关的蛋白质装置引导到（ER）粗面内质网（蛋白质进入内质网的细节见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。胶原蛋白亚基是作为加长多肽合成的，称为**前胶原**，包含前肽，是在氨基和羧基末端延伸的氨基酸尾部。

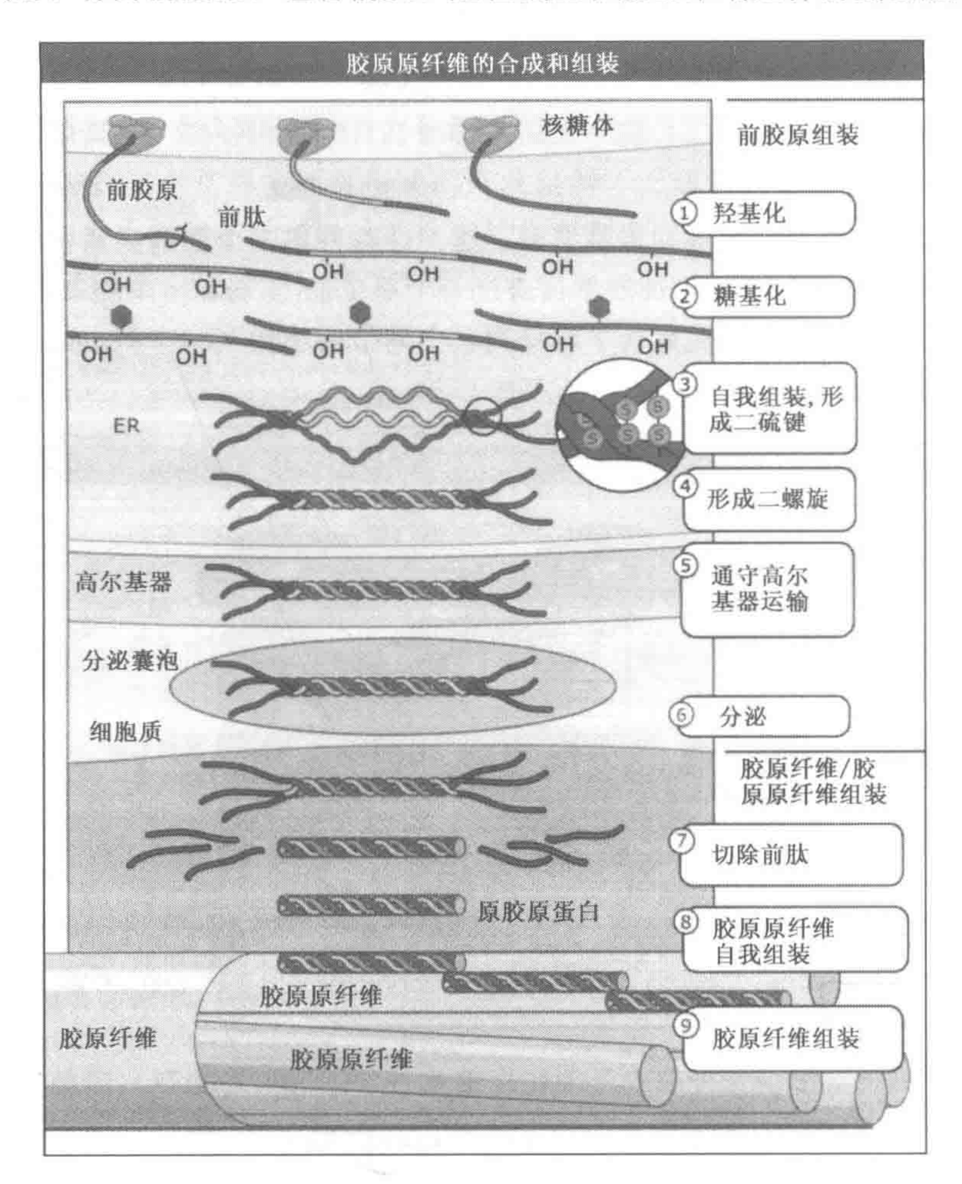


图 15.8 前胶原蛋白亚基的翻译后修饰及组装成三螺旋卷曲螺管是发生在分泌途经的细胞内运输过程中，而纤维的组装发生在卷曲螺管分泌之后的胞外空间。简明起见，三股结构中没有显示羟基和糖基。

前胶原一旦插入内质网腔，在由内质网运到高尔基并分泌小泡的过程中，就会经历一系列修饰（蛋白运输的细节见第 4 章蛋白质在膜之间的运输）。在前胶原从内质网运至高尔基体的过程中，羟基（—OH）会被加到前胶原中部的脯氨酸和赖氨酸上，形成羟脯氨酸和羟赖氨酸。这些修饰都是要确保卷曲螺管中维持三个亚基的氢键正确形成。氨基端和羧基端前肽之间能形成二硫键，这使前胶原亚基能正确形成三螺旋卷曲螺管。之后 C 端到 N 端的拉链自发形成螺旋。

前肽防止了卷曲螺管的相互作用，抑制了细胞内胶原蛋白的聚合。一旦前胶原三螺旋分泌出去，前胶原蛋白酶就将前肽剪切下来。由此得到的蛋白称为**原胶原蛋白**，几乎整个是一个三螺旋，是胶原原纤维的基本构建单位。

组装原纤维的机制很简单，原胶原蛋白的赖氨酸侧链由赖氨酰氧化酶修饰形成ε醛基赖氨酸，这些修饰后的赖氨酸形成共价交联，使得原胶原蛋白聚合，如图15.9所示。赖氨酰氧化酶是胞外酶，这一时期的装配只发生在前胶原分泌之后。一旦装配完成，这些原纤维可以进一步聚合形成大的纤维性质的胶原蛋白，如图15.8所示。

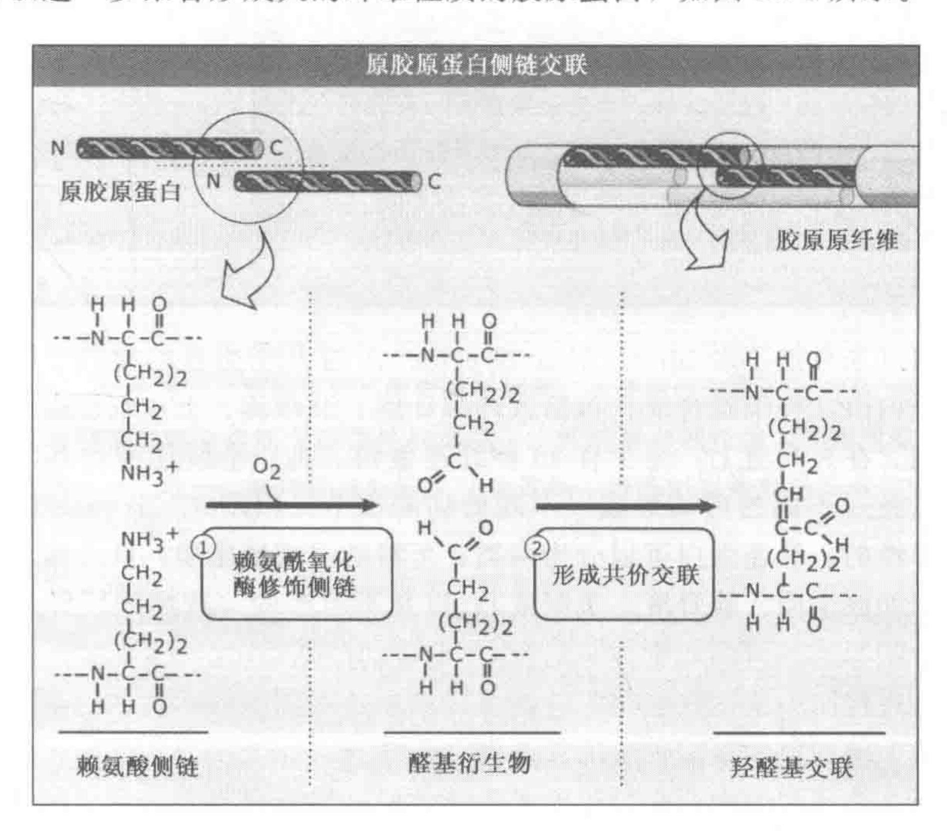


图15.9 赖氨酰氧化酶通过形成ε醛基赖氨酸（赖氨酸的醛衍生物）催化两个赖氨酸侧链的共价连接，形成羟醛交联。

鉴于胶原蛋白为组织提供结构支持的重要功能，你可以想象一旦胶原蛋白不能形成，后果会有多么严重。胶原蛋白或修饰前蛋白的酶的基因一旦发生突变就会产生一系列的遗传学病症，几乎影响所有组织。例如Ⅰ型胶原蛋白是骨骼中的初级结构蛋白，Ⅰ型胶原蛋白基因的突变会导致成骨缺陷，因而称为“脆骨症”。另一方面，Ⅳ型胶原蛋白基因的突变会导致大多数上皮组织基底膜结构异常、皮肤起疱，如大疱性表皮松解症（见15.11 基底膜是特化的细胞外基质）。

细胞通过特异性受体整联蛋白结合到胶原蛋白上。当细胞在胞外基质上移动时，受体以可逆的方式结合或释放胶原蛋白。整联蛋白受体也能激活信号通路，因此结合到胶原蛋白（及其他胞外基质蛋白）会改变细胞内的生化活性，因而有助于控制细胞生长和分化（整联蛋白的细节见15.13 大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体，15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导和15.15 整联蛋白和细胞外基质在发育过程中扮演重要角色）。

15.4 纤连蛋白将细胞与成胶原基质相连

关键概念

- 细胞外基质纤连蛋白的主要功能是将细胞与包含纤维胶原蛋白在内的基质相连。
- 已有至少 20 种纤连蛋白得到认定，每种都是从一个纤连蛋白基因经过不同的剪切形成的。
- 纤连蛋白的可溶形式存在于组织液中，不溶的形式在细胞外基质中形成纤维。
- 纤连蛋白纤维由纤连蛋白同型二聚体的交联聚合物组成。
- 纤连蛋白包括六个结构区域，每个区域都有一系列重复单位。
- 纤维蛋白、类肝素硫酸盐蛋白多糖和胶原蛋白都能结合到纤连蛋白的特殊区域并将纤连蛋白纤维整合到细胞外基质网络上。
- 一些细胞表达整联蛋白受体，能够和纤连蛋白的 Arg-Gly-Asp（RGD）序列结合。

纤连蛋白（来自拉丁语 fibra、fiber 和 nectere）在几乎所有的动物结缔组织中都有表达。纤连蛋白由几种细胞合成，包括成纤维细胞、肝细胞、上皮细胞以及神经系统中一些支持细胞。在人类身上，至少有 20 种纤连蛋白，由一个纤连蛋白基因的原始转录物在 4 个位点经过不同的剪切形成（不同剪切的细节见MBIO：15－0001）。这些差异都是细胞特异性的。纤连蛋白可以分为两类：可溶的（或原生质）纤连蛋白，存在于多种组织液中（如原生质、脑脊液、羊膜液）；以及不可溶的（或细胞）纤连蛋白，形成了所有组织中细胞外基质的纤维。

纤连蛋白在组织中连接细胞与胞外基质，调控这些细胞的形状和骨架排列，加速血液凝块的形成、辅助控制很多细胞的发育和创伤愈合。在受伤处，纤连蛋白在凝血过程中结合血小板，之后在创伤愈合过程中支持新细胞迁移覆盖受伤区域。很多肿瘤细胞也表达纤连蛋白，为细胞的转移提供基质。纤连蛋白对于正常的发育也是必要的，纤连蛋白缺陷的小鼠会在胚胎发育早期死亡。

细胞通过特异性受体整联蛋白结合到纤连蛋白上，像其他的整联蛋白受体一样，纤连蛋白受体能够激活细胞内的信号通路，控制细胞的死亡、迁移和分化（整联蛋白的细节见 15.13 大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体，15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导和 15.15 整联蛋白和细胞外基质在发育过程中扮演重要角色）。

细胞分泌的成熟纤连蛋白通常是可溶的二聚体，由两个二硫桥连接在一起，通常包括两拷贝相同的纤连蛋白剪切体（见图 15.12）。而纤连蛋白的二聚合作用对于不溶性的纤连纤维形成是十分必要的。可溶性纤连蛋白组装成不可溶的纤连蛋白网需要与细胞直接接触。尽管纤连纤维形成的机制尚不十分清楚，大多数模型都认为纤连蛋白二聚体首先通过整联蛋白受体结合到细胞表面，如图 15.10 所示。之后，细胞改变形状，这一过程使纤连蛋白分子拉伸成更加暴露的接近线性的结构。其他纤连蛋白二聚体结合到被拉伸的二聚体上，形成一个致密的网络，在显微镜下它们在细胞中呈现出与肌动蛋白纤维排列在一起的纤维组合，如图 15.11 所示。这些纤维能结合到细胞外基质的其他成分上，将基质编织成一个更强大、更有支持力的结构。

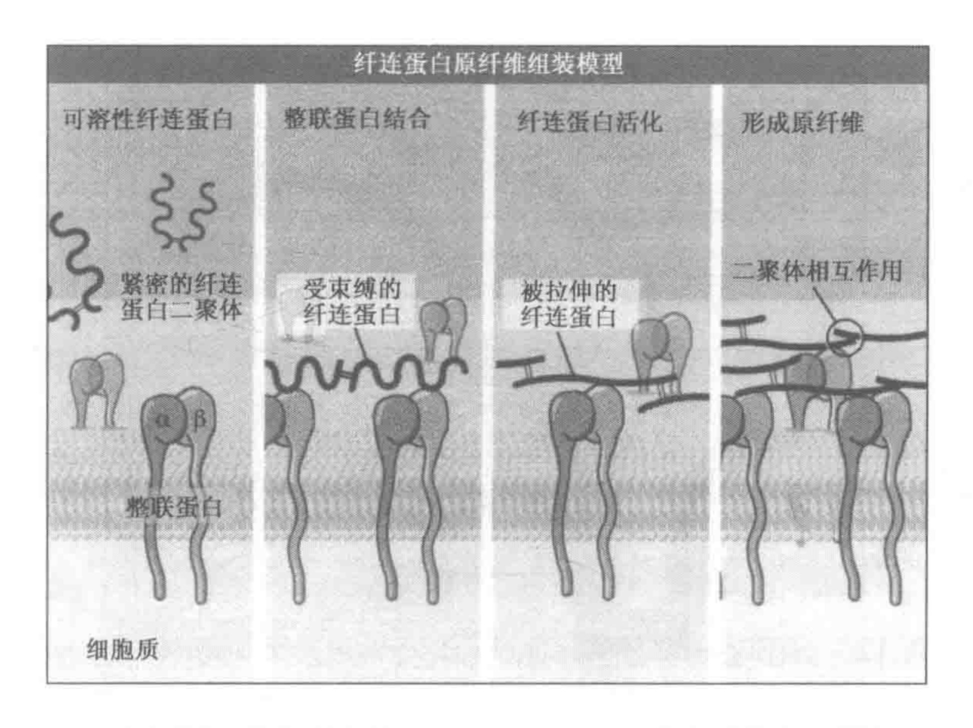


图 15.10　纤连蛋白二聚物是以折叠构象分泌的，这种构象阻碍了与其他二聚体的结合。在与细胞表面整联蛋白受体的作用下，纤连蛋白被拉伸，暴露出结合区，吸引了其他纤连蛋白二聚体。这导致了纤连蛋白二聚体的积累并组装成与细胞表面作用的原纤维。

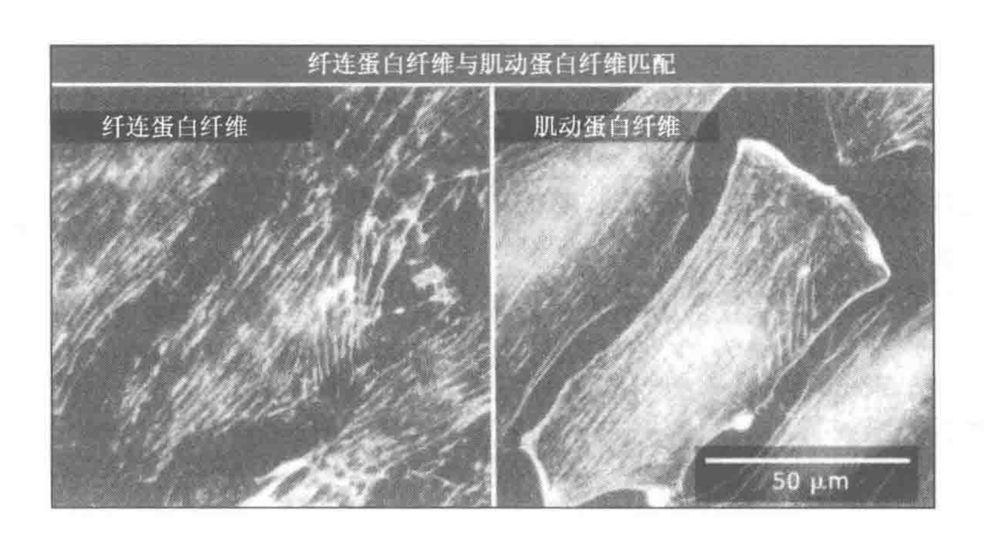


图 15.11　细胞免疫荧光染色显微图显示纤连蛋白纤维（左）和肌动蛋白纤维（右），两个网络是匹配的。整联蛋白受体和相关的蛋白将两个网络结合到一起。照片由麻省理工学院癌症研究中心的 Richard Hynes 惠赠。

为了实现多种功能，纤连蛋白结合胞外基质中许多其他的蛋白质。结合测定法是利用限制性的蛋白水解作用产生的纤连蛋白片段来揭示纤连蛋白的功能结构。纤连蛋白由一系列称为**纤连重复片段**的短序列组成。这些重复序列的精确排列根据剪切的不同而形成多个类型。重复序列可以分为三类：命名为Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型，从蛋白的氨基端起始连续编号。这些重复片段的功能见图 15.12。

近氨基端的谷氨酰胺残基是因子Ⅷa 的底物，Ⅷa 是一种酶，能连接纤连蛋白和纤

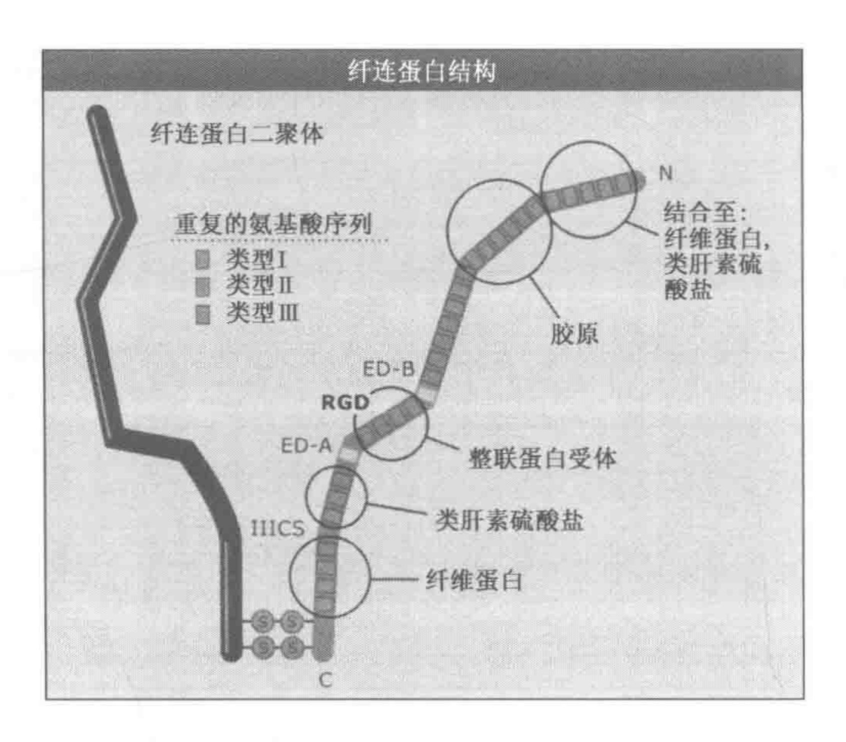


图 15.12　两个纤连蛋白多肽通过 C 端二硫键共价结合。每个多肽由小重复序列组成六个结构域。图中标明了主要的蛋白结合区域。

维蛋白、纤维蛋白原或凝血过程中其他的纤连蛋白。

Ⅰ型重复序列的 1-5 结合纤维蛋白参与凝血，也可以结合类肝素硫酸盐蛋白多糖（见 15.8 蛋白多糖参与组织水合作用）。

Ⅰ型重复序列的 6-9 和Ⅱ型重复序列的 1-2 结合胶原蛋白。

额外结构域 B（ED-B）形式多半发现于脂肪组织、愈合疮口以及肿瘤中，说明它可能对于细胞生长区域的组织重建十分重要。

Ⅲ型重复序列 8-11 结合细胞表面两个整联蛋白受体。在Ⅲ型重复序列 10 中是通过氨基酸序列 Arg-Gly-Asp(RGD) 结合的。这一区域在支持细胞粘连、生长、迁移当中有重要作用，并对纤连蛋白形成纤维至关重要。

额外结构域 A(ED-A) 像 ED-B 一样不存在于质膜纤连蛋白中。它的功能可能是增强细胞对纤连蛋白的结合，尽管这一点还没有被最终证实。

Ⅲ型重复序列 12-14 形成类肝素硫酸盐结合位点，结合多配体蛋白聚糖的受体。

Ⅲ型连接区域（ⅢCS）可以被剪切成不同大小从而形式不同的纤连蛋白。人类中至少发现了 5 种不同的ⅢCS 剪切形式，其中一些能在某些细胞中调控凋亡。这一模式能通过 Leu-Asp-Val 序列结合两个整联蛋白受体。

一个Ⅱ型重复序列和三个Ⅰ型重复序列组成纤维蛋白的第二个结合位点，参与凝血过程。

靠近蛋白的羧基端，两个半胱氨酸和另一个纤连蛋白多肽形成二硫键。

15.5 弹性纤维维持组织柔韧性

关键概念

- 弹性蛋白的主要功能是维持组织的弹性。
- 弹性蛋白单体（弹性蛋白原亚基）可以形成纤维，其强度和稳定性足以维持终生。
- 弹性纤维的力度来源于相邻弹性纤维单体的赖氨酸侧链形成的共价键。
- 弹性纤维的弹性产生于疏水区，在拉力作用下会发生伸展而在拉力释放后能自发重聚。
- 弹性蛋白原组装成纤维发生在细胞外空间，由三个步骤控制。
- 弹性蛋白的突变会产生一系列的病变，从轻度皮肤褶皱到幼年早期死亡。

弹性蛋白，顾名思义，是主要维持组织弹性的细胞外基质蛋白。弹性蛋白使组织能拉伸并回到原始大小而无需额外消耗能量。在血管、皮肤和肺组织中，柔韧性对器官的正常功能尤为重要，而其中弹性蛋白尤其丰富。比如，血管的柔韧性对于维持正常的血压至关重要。而肺的柔韧性保证了每次呼吸中气体的正常吐纳。

弹性蛋白是由成纤维细胞和平滑肌细胞合成分泌的，其中成纤维细胞是动物身上最丰富的细胞之一。这些细胞也分泌抗拉伸的胶原蛋白（见 15.3 胶原蛋白支撑着组织结构），其结果造成了每个器官细胞外基质韧性和强度的统一。通过改变细胞外基质中胶原蛋白和弹性蛋白的比例，细胞能调控器官的柔韧性。

弹性蛋白组成弹性纤维，弹性蛋白中心区的周围包被着直径 10～12nm 的微原纤维蛋白鞘，如图 15.13 所示。鞘的主要成分是微原纤维相关的糖蛋白，能结合弹性蛋白单体，有助于其形成更大的弹性纤维。这些纤维能持续保持高强度和稳定性（即它们不会被降解和替换）。纤维中的弹性蛋白也是脊椎动物体中最难溶解的蛋白。

弹性蛋白如何能有巨大的强度和稳定性同时又有高度的柔韧性呢？答案在它的结构组织中。弹性蛋白基因包括 36 个外显子，编码两种差异很大的序列：有些是疏水的，包含高浓度的赖氨酸残基，另一些富含亲水氨基酸，特别是甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸和缬氨酸。疏水序列分布在亲水序列之间，产生具有两种不同性质的很大的蛋白。弹性纤维的强度大多来自于相邻弹性蛋白赖氨酸侧链的共价交联，正如在胶原蛋白所发现的那样（如图 15.9）。对比之下，疏水区在低伸展情况下聚集成螺旋管，在施加拉力时解开螺旋，由此维持弹性，如图 15.13 所示。这些区域在解除压力的情况下又重新自发盘卷起来。甚至经过多年的研究，研究人员仍未就弹性纤维中弹性蛋白的精确构象达成共识。

细胞组装这样一种不可溶的蛋白会引发一些特殊的问题。如果这些蛋白在分泌前自发聚集，它们就会阻塞分泌通路或使细胞器和质膜发生破裂。细胞合成分泌弹性蛋白单体形式，只在分泌后在细胞外基质中对细胞内部没有威胁时才组装成纤维。

弹性蛋白的产生包括三个基本的部分，如图 15.14 所示：

弹性蛋白单体（**弹性蛋白原**）一旦产生就会结合到内质网 67kDa 的伴侣分子上。伴侣分子在分泌通路上维持与弹性蛋白原的结合，阻止弹性蛋白在胞内聚集。

分泌时，复合体通过伴侣分子结合在细胞表面，直到与弹性纤维鞘接触。随后新分泌的弹性蛋白原通过纤维鞘的糖基取代 67kDa 的伴侣分子而定位在弹性纤维上。

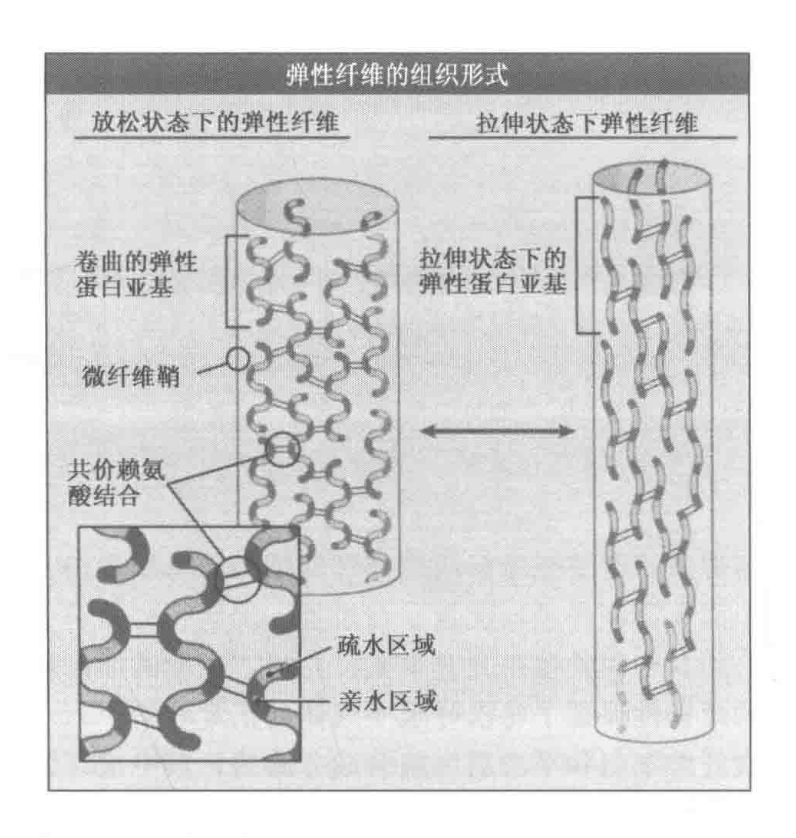


图 15.13 放松和拉伸状态下弹性纤维的图示。图中标明了每种状态下弹性蛋白亚基结构显著差异。亚基的精确结构尚不清楚。

很多释放出的弹性蛋白原单体的赖氨酸侧链都被赖氨酰氧化酶脱氨形成 ε 醛基赖氨酸，能和纤维中其他弹性蛋白的未修饰赖氨酸或 ε 醛基赖氨酸形成共价键（见图 15.9）。**成熟弹性蛋白**就是指经过赖氨酰氧化酶修饰后，组装到多聚体中的弹性蛋白。

就这样，三步法确保了弹性蛋白只在需要的部位完全组装。

正如我们预期的那样，弹性蛋白和弹性纤维组装或功能的变异都会导致严重的后果。皮肤松弛是与皮肤和连接组织中弹性纤维流失相关的疾病，其严重性可从轻度纤维瓦解和皮肤褶皱发展到弹性纤维量少到不能检测到。很少或几乎没有弹性纤维的病人不能维持组织的完整性，在幼年早期即会死亡。患有 Williams 综合征的病人会产生缺失的弹性蛋白，缺乏交联域，很难组装成纤维。这些病人的大动脉极度狭窄，可能是为了补偿动脉壁上的弹性纤维，动脉周围的平滑肌过度生长引起的。

15.6 层粘连蛋白为细胞提供连接底物

关键概念

- 层粘连蛋白是一个细胞外基质蛋白家族，实际存在于脊椎动物和无脊椎动物的所有组织中。
- 层粘连蛋白的基本功能是为细胞提供粘连底物，抵抗组织中的拉力。
- 层粘连蛋白是异三聚体，包含三个不同的亚基，盘卷在一起形成卷曲螺旋管构型。
- 层粘连蛋白异三聚体不形成纤维，它们结合接头蛋白使其在细胞外基质形成复杂的网络。
- 大量的蛋白结合到层粘连蛋白上，包括 20 多种不同的细胞表面受体。

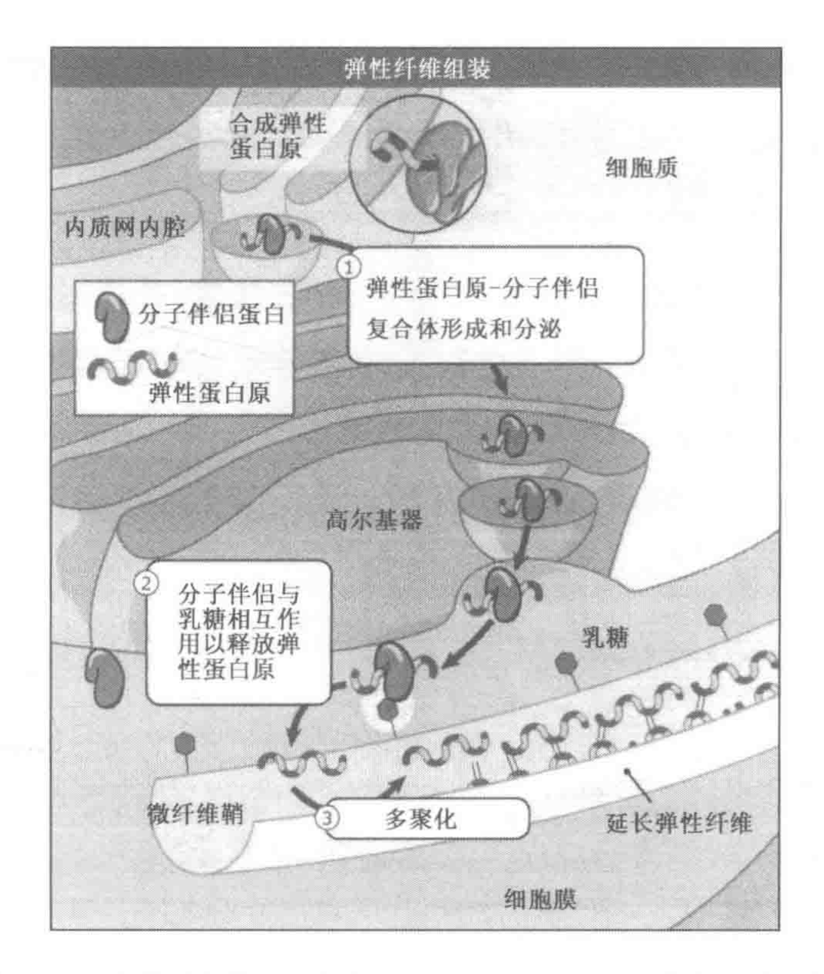


图 15.14　弹性蛋白单体（弹性蛋白原）在转运到细胞膜表面后仍和伴侣分子相连。伴侣分子结合到微纤维鞘，释放弹性蛋白单体。多聚化过程是赖氨酰氧化酶催化介导的弹性蛋白原交联。

层粘连蛋白是包含多种类型的细胞外基质大型蛋白（大于 100kDa）家族，存在于基底膜和很多不同组织的细胞外基质的一些位点上（基底膜的细节见 15.11 基底膜是特化的细胞外基质）。层粘连蛋白在脊椎动物和无脊椎动物中都有表达。层粘连蛋白家族成员之间的同源性相当低，说明它们有很长的进化史。

像胶原蛋白一样，层粘连蛋白也是由三个多肽亚基组成，盘绕在一起，形成三螺旋的卷曲螺旋管。在层粘连蛋白中构成这一卷曲螺旋管的序列是 7 个氨基酸，它们在三个亚基中都有多个重复。卷曲螺旋管增加了亚基间非共价键的数量，增强了完整三聚体的结构稳定性。卷曲螺旋管一旦形成，亚基通过二硫键共价连接。每个亚基只有一部分参与到卷曲螺旋管中。每个亚基还从螺旋管延伸出“臂”，产生十字形的结构，如图 15.15 所示。

层粘连蛋白是三聚体：一个蛋白中包含的 3 个亚基是 3 个不同基因的产物，可以分为 3 类：α、β、γ。迄今为止已经识别出 5 种 α 亚基、3 种 β 亚基和 3 种 γ 亚基。其中一些能通过不同的剪切形成额外的变型。这些亚基理论上能组合成 100 多种不同的异三聚复合体，但迄今仍只有 15 种复合体（异构体，编号 1～15）得到了认证。因此这使得单一生物体中可以构建多种不同的层粘连蛋白网络体系。

与细胞外基质中发现的其他糖蛋白不同，层粘连蛋白不形成纤维。它们组织成网状结构，能够抵抗许多方向上的拉力。层粘连蛋白的异三聚体短臂是每个亚基的氨

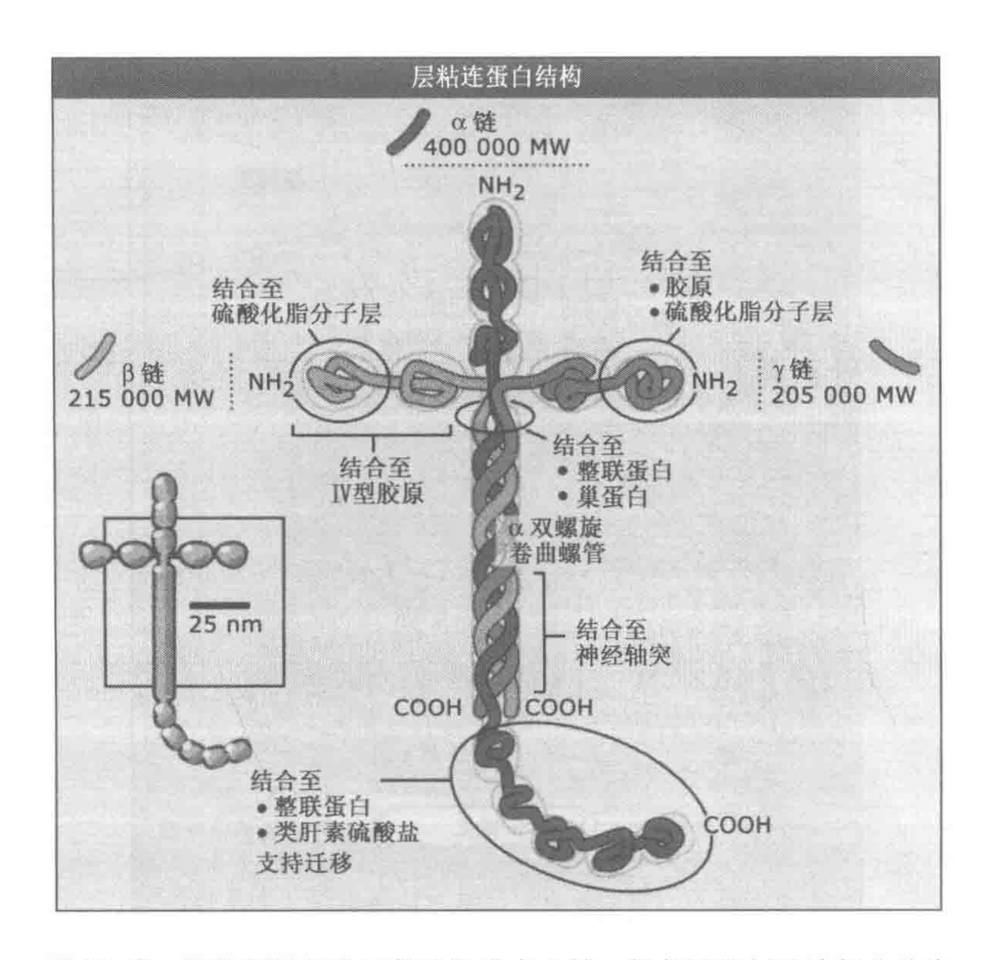


图 15.15　层粘连蛋白的三条链卷成中心轴。每条链的氨基端部分从中心轴延伸出来形成十字形结构。α 链的羧基尾部从中心轴延伸出来，形成五个球形域。图中标明了重要的结合区域。

基端部分，包含一些能与细胞外基质的其他成分相互作用形成广泛的网络结构域。一个典型的例子是层粘连蛋白-1 在基底膜中形成的网络，如图 15.16 所示。层粘连蛋白能够和其他细胞质基质成分，如内功素（也叫巢蛋白）、基底膜蛋白多糖、胶原蛋白Ⅳ相互作用。一些粘连蛋白亚基缺乏这些结构域，它们多聚化的机制尚不清楚。

层粘连蛋白的功能是什么？早期的形态学和生物化学研究表明层粘连蛋白-1 在基底膜中广泛表达，通过整联蛋白受体支持很多上皮细胞的附着与移动。基于层粘连蛋白的细胞移动需要足够强大的层粘连蛋白网，以对抗细胞骨架重塑带来的张力。很多蛋白结合到层粘连蛋白-1 上，其中一些（特别是内功素）在层粘连蛋白-1 装配成网络的过程中有关键作用。组织免疫学研究表明层粘连蛋白-1 早在小鼠 8 细胞胚胎时期就有表达，说明它在发育过程中也有重要作用。

进一步的研究部分地确定了支持细胞迁移和连接的层粘连蛋白，以及层粘连蛋白在发育中的作用。就像研究纤连蛋白的方法一样，温和蛋白酶的限制性消化作用能够将完整的分子降解成小功能单位，从而测定与其他蛋白的结合作用。目前这些研究结果得到了层粘连蛋白结构域功能图，但这一功能图还不如其他蛋白，如纤连蛋白那样详尽（见 15.5 弹性纤维维持组织柔韧性）。这是因为纤连蛋白形成连续的卷曲螺旋管，即使有限的蛋白质降解也会将单个区域分解。

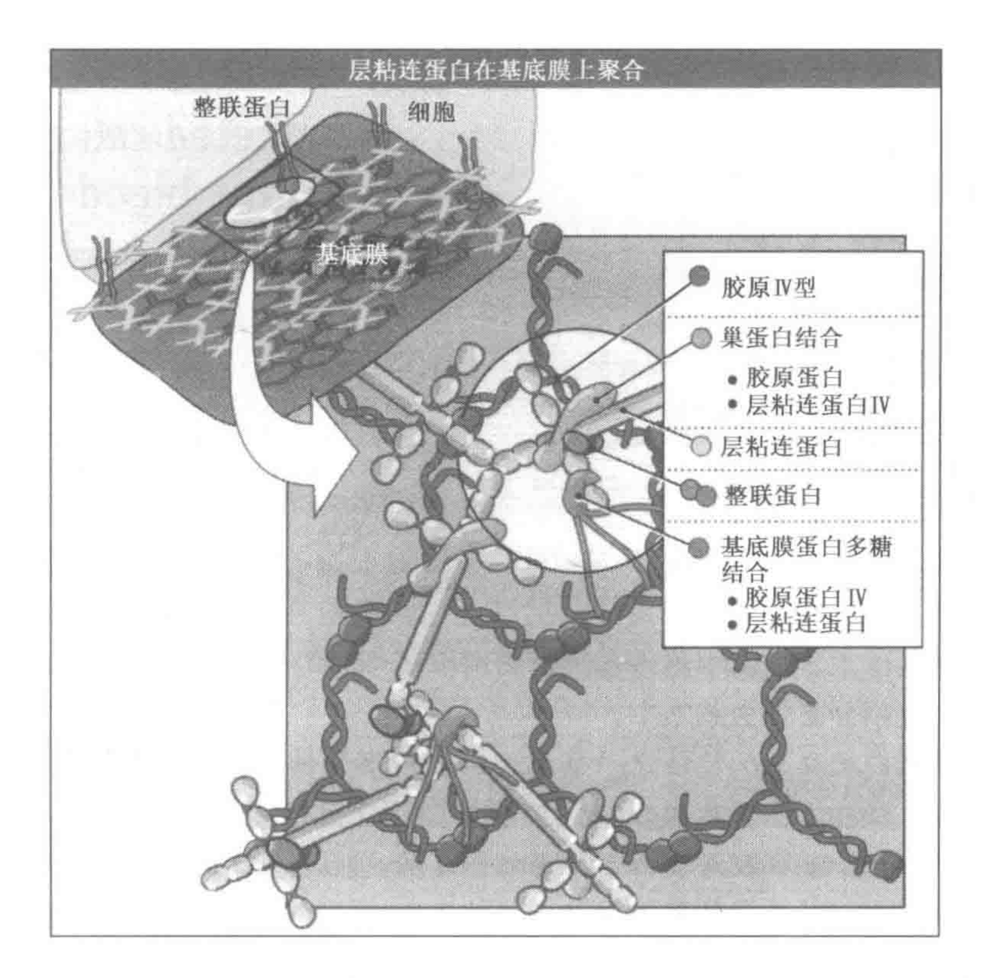


图 15.16　层粘连蛋白至少与 3 个或更多的细胞外基质蛋白相互作用，在基底膜上形成网络。层粘连蛋白也结合基底膜细胞伸出的整联蛋白受体。

我们现在知道大量与层粘连蛋白各区域相关的具有某些功能并与之结合的分子。例如，已鉴定出 20 多种层粘连蛋白-1 的不同受体。除此之外，如图 15.15 所示，层粘连蛋白上的多个位点，如 α 链氨基端的球形结构域，在调控细胞迁移方面有重要作用。层粘连蛋白的主要受体包括 3 个整联蛋白和 1 个 67kDa 的非整联蛋白。这些受体交替和细胞骨架的不同成分相互作用，结合不同的信号通路蛋白复合体，因此每个层粘连蛋白受体对细胞行为都有不同的影响。调控细胞对层粘连蛋白结合域起作用的机制尚待阐明。

生物中层粘连蛋白-1 和-5 的突变会破坏基底膜的组织，改变特异性粘连复合体半桥粒的形成（见 15.20 半桥粒连接上皮细胞和基底膜）。这些突变是很多遗传性皮肤病的起因（见 15.11 基底膜是特化的细胞外基质）。实验通过反向遗传技术，在表达突变重组层粘连蛋白基因的生物个体中发现：层粘连蛋白-2 亚基的突变会在大多数遗传性肌肉营养不良的严重病例中导致肌肉细胞基底膜的瓦解。发育生物学研究通过敲除小鼠基因，确立了层粘连蛋白在神经元靶向特异细胞受体过程中和肾脏基底膜形成过程中的重要作用。

15.7 玻璃粘连蛋白在凝血过程中促进靶细胞的黏着

关键概念

- 玻璃粘连蛋白是一种细胞外基质蛋白，能以可溶形式在血浆中循环。
- 玻璃粘连蛋白能结合很多不同的蛋白，如弹性蛋白、整联蛋白、凝血因子、细胞溶解因子和细胞外蛋白酶。
- 玻璃粘连蛋白在受伤组织中促进血液凝块的形成。
- 为了对凝血因子在组织中的沉积进行靶定，玻璃粘连蛋白必须由溶解形式转变为非溶解形式，结合到凝血因子上。

玻璃粘连蛋白是一种较小的（75kDa）多功能细胞外基质糖蛋白，主要分布于血浆、创口以及其他正在进行组织重建的区域。它高度糖基化：大约 1/3 的基团是 *N* 连接的糖。不像其他大多数的细胞外基质蛋白由很多不同组织的细胞合成，玻璃粘连蛋白由肝脏合成，直接分泌到血浆之中。

玻璃粘连蛋白最显著的特征之一是其能结合很多其他种类的蛋白，包括胶原蛋白、整联蛋白受体、凝血因子、免疫反应的细胞溶解因子和涉及细胞外基质降解的蛋白酶（这些蛋白的细节见 15.3 *胶原蛋白支撑着组织结构*，15.13 *大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体*和 15.12 *蛋白酶降解细胞外基质成分*）。玻璃粘连蛋白单体也能彼此结合，形成高分子质量的复合体。经过一系列结合试验检测合成的肽链片段，鉴定出了玻璃粘连蛋白负责上述活性的特异性结合区域，其结果是得到了成串存在于蛋白质氨基和羧基末端的结合结构域的图，如图 15.17。

很多结合到玻璃粘连蛋白上的蛋白质是酶，它们如果在体内错误的时间或错误的地点激活就会有很大的危害。比如，脑中凝血块的形成会导致中风。因此，控制玻璃粘连蛋白结合其配体的时间和地点都是相当重要的。完成这一点最基本的方法相当简单：玻璃粘连蛋白单体自我结合，因而直到需要时才解开。折叠是 N 端的负电荷氨基酸和 C 端的部分正电荷氨基酸离子吸引的结果。通过查阅图 15.17 的结合位点图，我们可以看到玻璃粘连蛋白的两端是如何相互作用，防止这些位点结合配体的。

折叠的玻璃粘连蛋白单体在血液中循环，不轻易解折叠。普遍接受的观点是玻璃粘连蛋白在起始结合配体时必须至少部分解折叠，而这一解折叠如何发生尚不清楚。纯化的玻璃粘连蛋白研究表明在体外，它的结构对 pH 和离子浓度变化非常敏感，说明血浆中的变化可能起始了解折叠。也可能是一小群循环中的玻璃粘连蛋白单体自发解折叠。

玻璃粘连蛋白一旦解折叠暴露出结合域，可能导致大量的后果发生，包括血浆中玻璃粘连蛋白的大量聚集和细胞对这些聚集物的结合。在血液凝块形成的过程中，玻璃粘连蛋白就会成为血液凝块起始处的一个平台。部分解折叠的玻璃粘连蛋白分子暴露了血小板整联蛋白受体的结合位点（见图 15.17），因此将血小板补给到受伤的血管。结合的血小板被激活，释放其他因子促进凝块的形成。

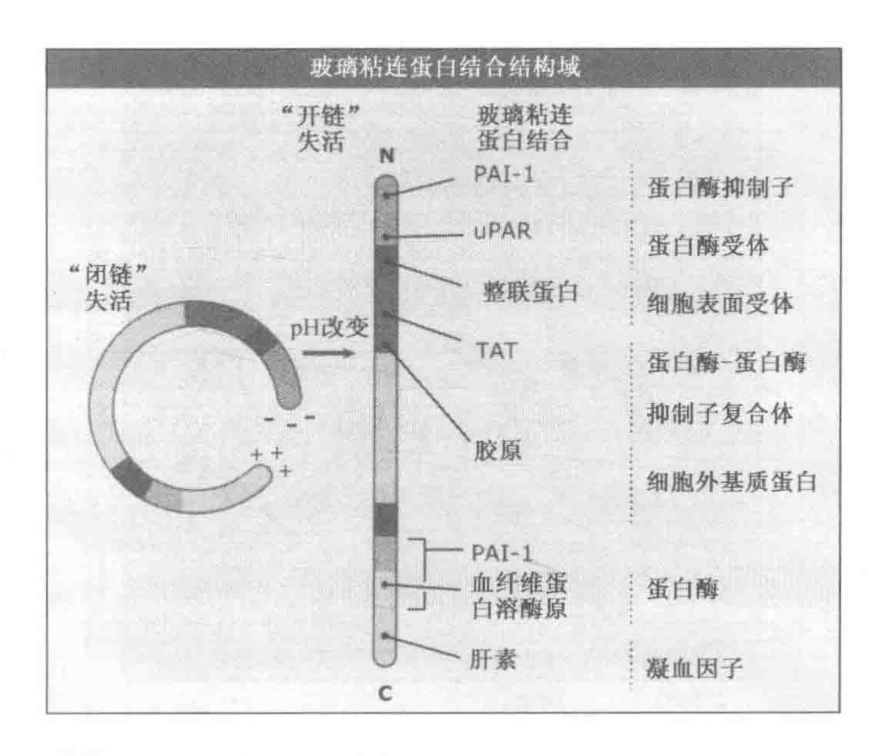


图 15.17 玻璃粘连蛋白结构组织模型。循环的玻璃粘连蛋白绞合在一起防止结合到其他蛋白。环境条件的改变会部分解开玻璃粘连蛋白，促进蛋白的结合。图中标出了已知的蛋白结合位点。

15.8 蛋白多糖参与组织水合作用

关键概念

- 蛋白多糖是由中央蛋白核及结合其上的称为葡萄糖胺聚糖（GAG）的双糖线形长链组成。
- 蛋白多糖上的 GAG 链是带负电的，由于电荷排斥使蛋白多糖呈杆状、刚毛形状。
- GAG 刚毛是组织中抑制细菌和病毒扩散的过滤器。
- 蛋白多糖吸水形成凝胶，保持细胞水化，缓冲组织的流体力学压力。
- 蛋白多糖能结合多种细胞外基质成分，包括生长因子、结构蛋白和细胞表面受体。
- 蛋白多糖的表达是细胞类型特异性的，受到发育调控。

蛋白多糖是细胞外基质中结构糖蛋白（如胶原蛋白和弹性蛋白）的类似物。结构蛋白提供抗张力，而蛋白多糖确保细胞外基质是一个水化凝胶。这对组织抵抗压缩力是十分重要的。

像细胞表面表达丰富的其他糖蛋白一样，蛋白多糖由单一的多肽核及其结合的糖（聚糖）组成。现已鉴定出 40 多种蛋白多糖中心多肽，每种都包含标准结构域，能结合细胞质基质中的其他成分，包括糖类、脂类、结构蛋白、整联蛋白受体和其他的蛋白多糖。图 15.18 显示了蛋白多糖的类型。大多数蛋白多糖是由细胞分泌的，如核心蛋白多糖和聚集蛋白聚糖，但有两种类型是膜结合的。糖蛋白的多配体蛋白聚糖家族成员包含跨膜结构域，磷脂酰肌醇蛋白聚糖通过糖基磷脂酰肌醇连接锚定在膜上。

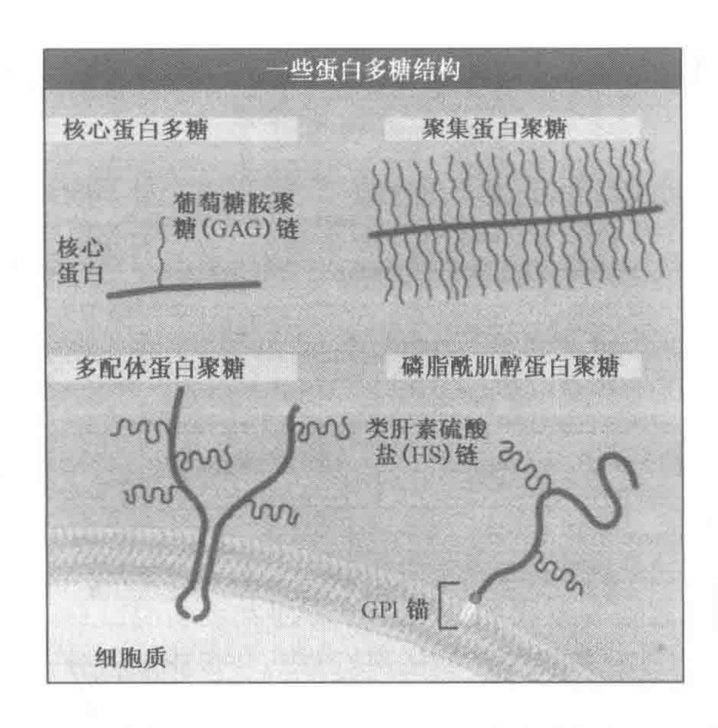


图 15.18　蛋白多糖结构总览。所有的蛋白多糖都有 GAG 链结合到中央蛋白。蛋白多糖可以是分泌的，也可以通过跨膜中心域或中心蛋白上锚定的糖基磷脂酰肌醇 I 结合到质膜上。

蛋白多糖彼此区别是通过其结合糖基的类型及排列。结合到蛋白多糖的糖称为**葡萄糖胺聚糖（GAG）**，是二糖重复的线状长链。这些链连接着数以百计的糖，分子质量可达 1000kDa。如图 15.19 所示，GAG 基于其包含的双糖可以分为五类，除了一类（透明质酸）以外，都能结合到蛋白上形成蛋白多糖。GAG 包含酸性糖或使其带高度负电的硫酸盐糖。

建造蛋白多糖的步骤如图 15.20 所示。中心蛋白在粗面内质网合成（ER），所有的中心蛋白都包含内质网定位序列，大多数都是可溶性的分泌蛋白，整体易位进入内质网腔。多配体蛋白聚糖仍然镶嵌到膜上，因为它们包含停止迁移序列。磷脂酰肌醇蛋白聚糖的中心蛋白通过脂连接糖基和 GPI 的添加得到修饰（这一过程的细节见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。

中心蛋白通过分泌通路加工，糖基转移酶连接木糖、半乳糖、葡萄糖醛酸到中央蛋白的丝氨酸和天门冬氨酸残基上。中心蛋白的特异性氨基酸序列决定了连接糖的类型和定位。这些糖是其他糖的连接位点，如组成 GAG 链的 *N*-乙酰葡糖胺。GAG 链可以通过重排糖基的结构（差向异构酶）或向糖基添加硫酸基（硫转移酶）进一步修饰。一些蛋白多糖还有 *N* 连接或 *C* 连接的寡糖糖蛋白（*N* 连接糖的细节见 3.14 许多蛋白质在易位时发生糖基化）。新合成的蛋白多糖在反式高尔基网分选进入调控的分泌通路，存储在分泌小泡直到通过胞吐作用释放。各种信号，包括压力的作用，都能刺激蛋白多糖的分泌（调控分泌的细节见第 4 章蛋白质在膜之间的运输）。

蛋白多糖可以有 1～100 多个大的 GAG 结合。因为很多糖带负电，GAG 之间会互相排斥。蛋白多糖带有很多 GAG，这将产生一种力使蛋白多糖成为一个杆状、刚毛型结构，GAG 向外伸出。成熟的蛋白多糖像一个带刚毛的杆，更像是毛刷，如图 15.18。

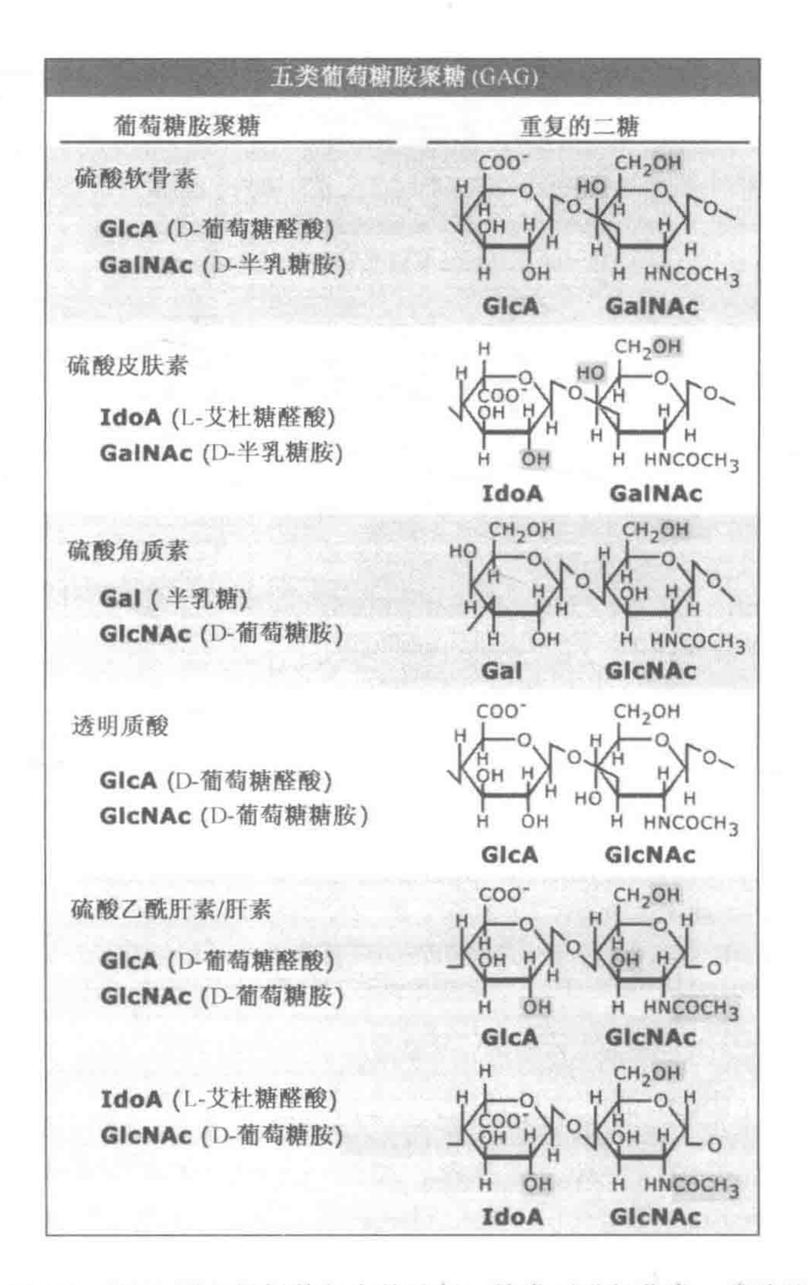


图 15.19　GAG 可以根据其包含的重复二糖类型进行分类。磷酸基加在二糖标记出的位置。改编自 Prydz, K., and Dalen, K. T. *J. Cell. Sci.* 2000. 113: 193-205。

这一独特的性质使蛋白多糖具有某些有助于确定细胞外基质的本质的特征。首先，它们相对刚硬的结构使之可以作为结构支架，支撑其所在组织的整体形状。其次。蛋白多糖辅助免疫系统：GAG 刚毛在细胞外基质中能过滤细菌和病毒，减小组织感染的几率。第三，GAG 的负电可以吸引阳离子，它们依次吸引水分子，因此蛋白多糖充分水化形成凝胶。这些凝胶帮助保持细胞水化，提供水环境，协助细胞间小分子的扩散，使组织能承受很大的压力变化而不变形，这些压力变化发生在比如钝力、损伤或剧烈运动中。

第四，蛋白多糖结合很多其他蛋白质，其中最重要的一类蛋白质是生长因子。细胞将生长因子分泌到血浆、组织液中，使它们在体内循环。如图 15.21 所示，蛋白多糖结合控制这些生长因子，增加它们在细胞外基质中的浓度。这一结合也能使生长因子定位在组织中的特异区域，保护它们不被细胞外蛋白酶降解。有些情况下，这一控制对于细

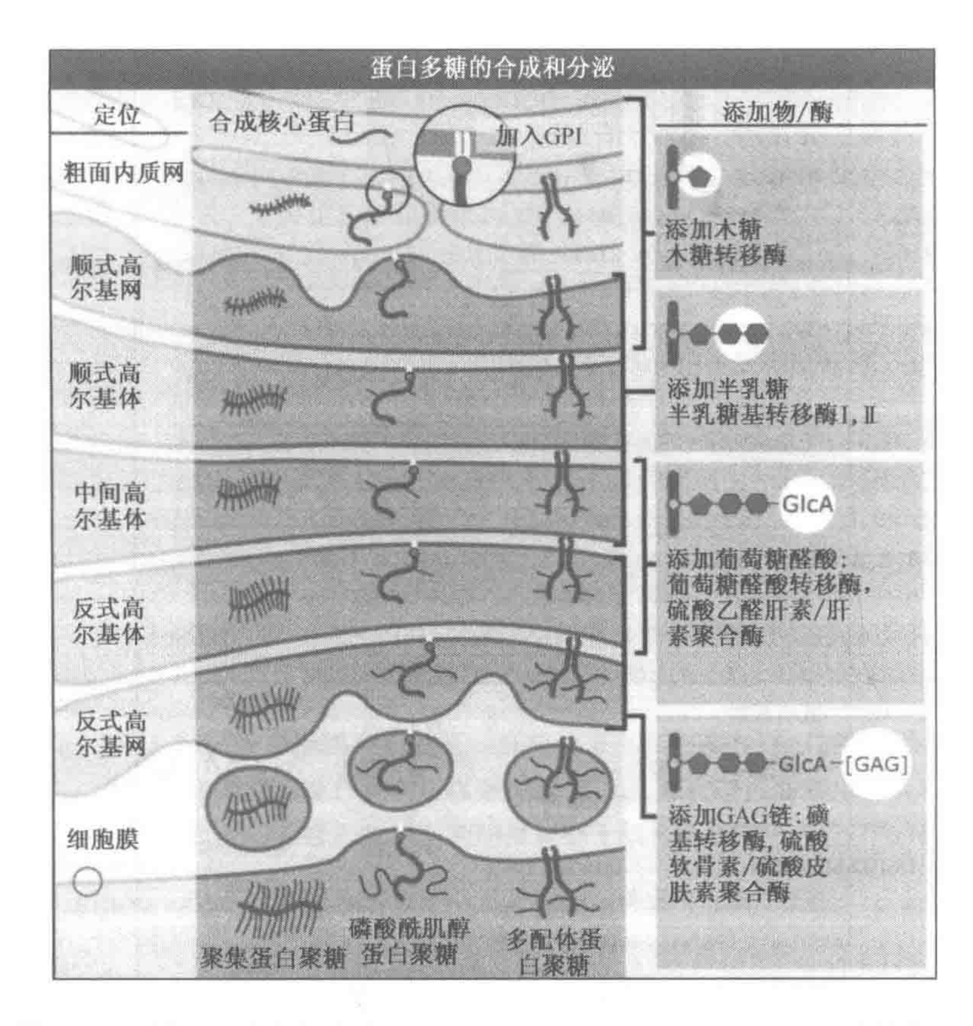


图 15.20　蛋白多糖在经由分泌通路过程中组装。图中标出了重要酶的位置。

胞结合生长因子十分必要。因此，蛋白多糖能作为生长因子受体，在组织内间接控制细胞生长。生长因子甚至能以这种状态储存，在蛋白多糖分解时再被释放（见 15.12 蛋白酶降解细胞外基质成分）。

蛋白多糖也能结合、调控其他细胞外基质蛋白的组装。比如，蛋白多糖中的聚集蛋白聚糖和核心蛋白多糖能够结合胶原蛋白（见 15.3 胶原蛋白支撑着组织结构）。聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原蛋白纤维在软骨中形成大的聚集物，如图 15.22。为了形成聚集物，聚集蛋白聚糖分子通过连接蛋白结合透明质烷（见 15.9 透明质烷是结缔组织中含量丰富的葡萄糖胺聚糖）。核心蛋白多糖是胶原蛋白纤维之间的间隔物，控制纤维半径和组装速率。核心蛋白多糖基因敲除的小鼠，其胶原蛋白纤维形状不规则，皮肤呈脆性。

蛋白多糖的表达受发育调控，并有细胞类型特异性。比如，在发育的鸡胚中，聚集蛋白聚糖主要在软骨组织中表达，第 5 天合成软骨组织的软骨细胞分化出来，这时聚集蛋白聚糖达到最大表达。然而，在脑和脊髓发育过程中，也有低水平表达，并在第 13 天达到高峰。蛋白多糖如聚集蛋白聚糖的表达由结合蛋白多糖的同一生长因子调控，说明蛋白多糖在调控自身表达上具有一定的作用。

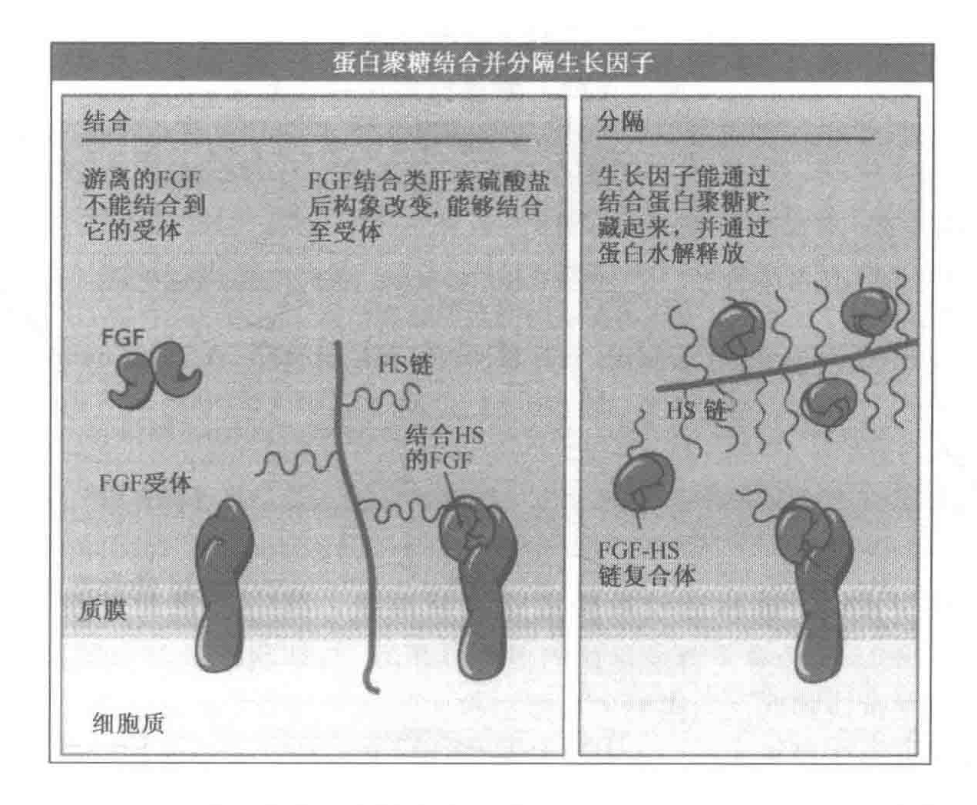


图 15.21　蛋白多糖协助分隔细胞表面附近的生长因子，控制它们结合到细胞表面受体。这是一个类肝素硫酸盐辅助成纤维细胞生长因子（FGF）结合到细胞受体的模型。

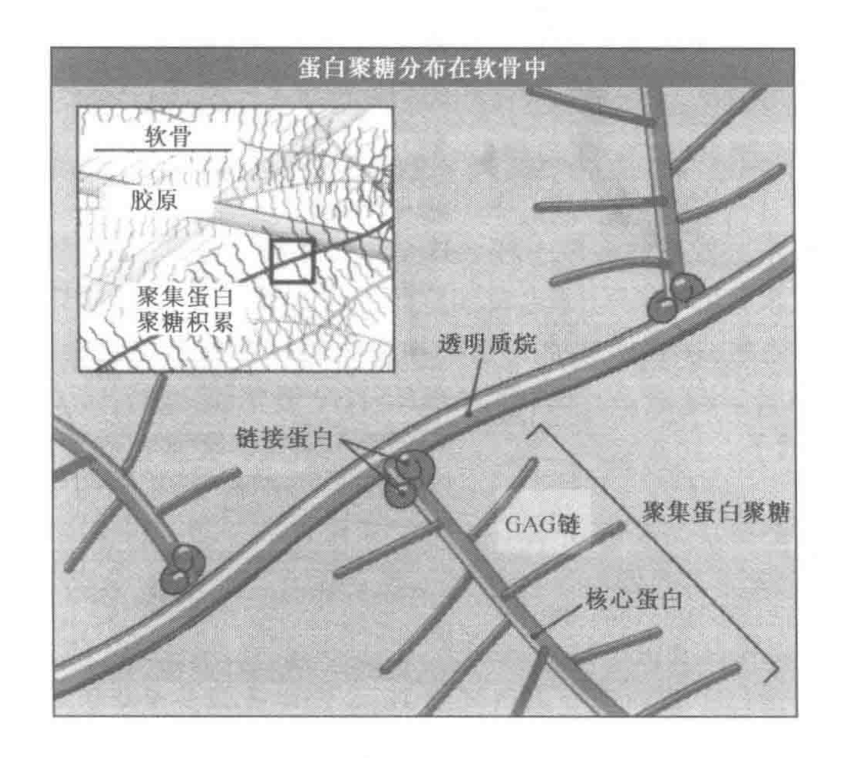


图 15.22　蛋白多糖如聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原蛋白纤维在软骨中形成复合体。聚集蛋白聚糖结合透明质烷分子，吸引水分子，对抗压缩力，起润滑剂的作用。

15.9 透明质烷是结缔组织中含量丰富的葡萄糖胺聚糖

关键概念

- 透明质烷是一种葡萄糖胺聚糖，在细胞外基质中与蛋白多糖形成巨大的复合体。这些复合体在软骨组织中特别丰富，透明质烷通过接头蛋白与蛋白多糖中的聚集蛋白聚糖相关联。
- 透明质烷带有高负电荷，因此在细胞外空间中结合阳离子和水，这就增加了细胞外基质的稳定性，为细胞间提供了水缓冲，以缓解压缩力。
- 透明质烷是由重复双糖连接到长链上形成的。
- 与其他的葡萄糖胺聚糖不同，透明质烷链是在质膜的胞浆面合成，再运出细胞。
- 细胞通过附着物受体家族结合到透明质烷，起始了控制细胞迁移和细胞骨架形成的信号通路。

透明质烷（HA），也称透明质酸或透明质酸盐，是一种葡萄糖胺聚糖（GAG）（GAG 的细节见 15.8 蛋白多糖参与组织水合作用）。与细胞外基质中发现的其他 GAG 不同，它没有共价连接到蛋白多糖中心蛋白核上，而是和分泌的蛋白多糖形成巨大的复合体。这些复合体中最重要的一种是在软骨组织中发现的，软骨细胞（形成软骨组织的细胞）分泌的 HA 分子与多达 100 拷贝的聚集蛋白聚糖结合（见图 15.22）。聚集蛋白聚糖的中心蛋白和 HA 分子间隔 40nm，通过一个同时连接二者的小连接蛋白间接相互作用。聚集蛋白聚糖长度可达 4mm 以上，分子质量超过 2×10^8Da。以这种方式，HA 在软骨组织细胞外基质中创造了很大的水化空间。这些空间对于血管密度较低的组织尤为重要，因为它们能够辅助营养物和废物穿过胞外空间的扩散。

HA 的结构相当简单，像所有的 GAG 一样，它是二糖的线状多聚物，葡萄糖醛酸通过 β（1—3）键连接 *N*-乙酰-葡萄糖胺。HA 分子通过 β（1—4）键平均连接 10 000 个（可多达 50 000 个）这样的二糖，如图 15.19 所示。因为这些二糖带负电，所以它们能结合阳离子和水。像蛋白多糖一样，HA 增加了细胞外基质的硬度，成为连接组织如关节的润滑剂。水化的 HA 分子也在细胞间形成水缓冲带，使组织能承受压缩力。

HA 分子比其他的 GAG 大得多。它们如此庞大，以致于细胞为合成它们必须消耗巨大的能量。据估计，合成一个中等大小的 HA 链需要消耗 50 000 个 ATP 当量，20 000个 NAD 辅因子，10 000 个乙酰-CoA 基团。因此，大多数细胞中 HA 的合成受到严格的控制。

HA 的合成是由质膜上跨膜的 HA 合成酶催化的。这些酶在质膜的胞浆面组装 HA 多聚体，再将组装好的 HA 跨膜运输，送入胞外空间。这种酶多少有些特别，这一过程和其他 GAG 的合成也完全不同，其他的 GAG 是在高尔基复合体合成，穿过分泌通路时再共价连接到蛋白多糖的中心蛋白（见 15.8 蛋白多糖参与组织水合作用）。

调控 HA 合成的重要方式是改变 HA 合成酶的表达量。酶的表达是根据细胞类型特殊性由生长因子诱导的。例如，成纤维细胞生长因子和白细胞介素-1 诱导其在成纤维细胞中表达，而糖皮质激素抑制在这些细胞中的表达；表皮生长因子刺激其在角质化细胞中的表达，但不影响成纤维细胞中的表达。HA 的分泌控制独立于 HA 的合成，因此组织中 HA 水平的控制至少有两种途径。

除了在组织水化当中的作用，HA 还能结合特异性的细胞表面受体，刺激胞内控制

细胞迁移的信号通路。HA 最主要的受体是 CD44，属于**附着物受体家族**，该家族均能结合 HA。这一家族的其他成员包括蛋白多糖（如多功能蛋白聚糖、聚集蛋白聚糖及短蛋白聚糖等）和连接蛋白（在软骨组织中连接 HA 和聚集蛋白聚糖）。多种形式的 CD44 是由同一 CD44 基因转录物的不同剪切产生的，而这些异构体间的功能差异并不明显。CD44 在多种细胞中是同型二聚体，而在上皮细胞中与 ErbB 酪氨酸激酶形成异二聚体。

CD44 的细胞质尾部有几种功能，它对于 HA 的正确结合、受体到达细胞表面的分选以及有效的胞内信号都是必需的，如图 15.23 所示。通过在培养细胞中表达变异的 CD44 及其检测结合 HA 后信号转导通路活性，得到了 CD44 胞质尾段的功能域图谱。通过这些研究我们知道 CD44 同二聚体和 CD44/ErbB 异二聚体能激活非受体酪氨酸激酶，如 Src，以及小 G 蛋白 Ras 家族成员。这些激酶活化下游信号蛋白，如蛋白激酶 C，MAP 激酶及核转录因子。

此外，CD44 介导的信号能通过活化肌动蛋白结合蛋白：胞影蛋白和小 G 蛋白 Rac1，改变细胞表面肌动蛋白细胞骨架的组装，如图 15.23 所示。肌动蛋白重组的一个结果是 CD44 介导的 HA 结合启动细胞迁移。在肿瘤中，CD44 表达的增加以及 HA 的分泌增加了肿瘤的侵润性及较差的预后。

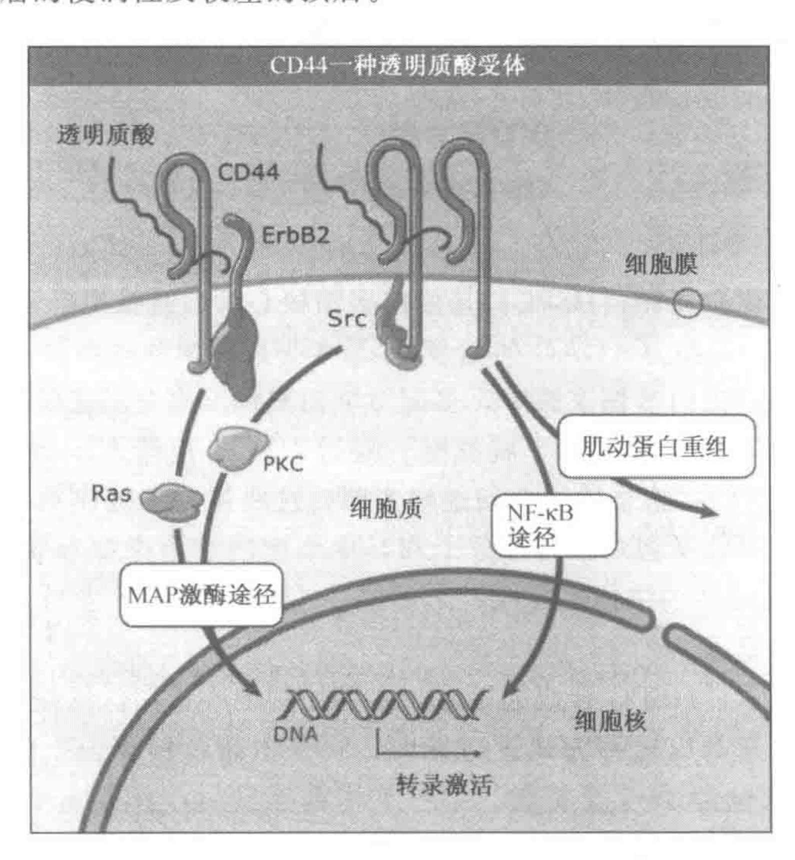


图 15.23　CD44 形成同二聚体，或与 ErbB 受体形成异二聚体。这些复合体结合很多信号分子控制细胞骨架的组织和基因表达。

通常认为 HA 在起始细胞迁移上有两个作用。首先，通过结合细胞外基质分子，它能改变细胞间、细胞与基质间的相互作用。不表达 HA 的小鼠胞间距很小，因此不能正常发育。由于 HA 有很大的水化体积，肿瘤中增加 HA 的分泌可能破坏细胞外基

质的完整性，创造了更大的空间使肿瘤细胞可以迁移。第二，HA 结合 CD44 受体可以激活胞内信号通路直接导致细胞骨架的重排和细胞迁移的增多。这一点的证据来自一个实验：将 HA 加到培养的细胞中，表达 CD44 的细胞一旦和 HA 结合几乎立即发生迁移，而用药物阻断 CD44 相关的已知胞内信号分子就能够抑制这一迁移。

HA 的胞内储存库已经被发现，但其功能尚不清楚。一些 HA 合成后仍然留在胞浆中，一些新分泌的 HA 会通过胞吞作用内化。胞内 HA 量随着细胞周期变化。一些参与控制细胞增殖的胞质蛋白也能结合 HA。这些观察说明 HA 可能作为内部信号分子调节细胞分裂。

15.10 硫酸类肝素蛋白多糖是细胞表面复合受体

关键概念

- 类肝素硫酸盐蛋白多糖是蛋白多糖的一个亚型，包含葡萄糖胺聚糖类肝素硫酸盐链。
- 大多数类肝素硫酸盐存在于两个膜结合蛋白多糖家族中：多配体蛋白聚糖和磷脂酰肌醇蛋白聚糖。
- 类肝素硫酸盐由 30 多种不同的糖亚基联合组成，这使类肝素硫酸盐蛋白多糖的结构和功能有很大的可变性。
- 细胞表面类肝素硫酸盐蛋白多糖在多种细胞中都有表达，可以结合 70 多种不同的蛋白。
- 细胞表面类肝素硫酸盐蛋白多糖是可溶性蛋白如生长因子及不溶性蛋白如细胞外基质蛋白的复合受体，它们帮助一些蛋白内化。
- 果蝇的遗传学研究表明类肝素硫酸盐蛋白多糖在生长因子信号转导和发育过程中都具有功能。

类肝素硫酸盐蛋白多糖（HSPG）是蛋白多糖核心蛋白连接类肝素硫酸盐（HS）的一类葡萄糖胺聚糖（GAG）（GAG 的细节见 15.8 蛋白多糖参与组织水合作用）。HS 主要存在于两个膜结合蛋白多糖家族中，多配体蛋白聚糖（富含脯氨酸的跨膜蛋白）和磷脂酰肌醇蛋白聚糖（球状、富含半胱氨酸、通过 GPI 连接糖不牢固地连接到质膜上，见图 15.18）由于它们在组装后结合到细胞表面，这些蛋白多糖在调控细胞和细胞外基质的其他成分，包括结构蛋白、信号分子和其他细胞的结合中都有关键作用。本章中，我们会首先探究 HSPG 的结构多样性，之后描述 HSPG 相关的多种细胞功能在生物化学和遗传学上的证据。

如图 15.20 所示，HSPG 合成起始时，木糖加到中心蛋白丝氨酸侧链的羟基上。不是所有的丝氨酸残基都以这种方式进行修饰，只有木糖转移酶识别的那些序列才会如此。大多数 HSPG 包含 3～7 个糖链。第一个木糖连接后，其他三个糖快速连接上去，形成丝氨酸-木糖-半乳糖-半乳糖-葡萄糖醛酸的“四糖接头”。之后，另一个木糖加到葡萄糖醛酸上。

HSPG 复合体合成的完成还需要四个主要的步骤和至少 14 种不同的酶，其中一些如图 15.20 所示。首先，50～150 拷贝的双糖 *N*-乙酰葡糖胺糖醛酸（GlcNac-GlcA）连接到类肝素硫酸盐多聚物四糖接头末端的木糖上，核心蛋白通过高尔基体加工。第二，其他酶通过硫酸盐基团替代 *N*-乙酰基团修饰一些 GlcNac 糖（在一些特殊的氨基酸序列中）。第三，链中的一些 GlcA 酸通过差向异构形成艾杜糖醛酸。最后在蛋白多糖离开

高尔基体之前，其他的硫酸盐加到艾杜糖醛酸和仍未修饰的 GlcNac 糖上（最高度硫酸化的 HS 形式称为肝素，一种临床上使用的自然抗凝血剂）。

糖修饰的结果是 HSPG 数量庞大的多样性结构。由于 5 种结构修饰，产生 32 种不同的双糖结构单位，这就使 HS 链比蛋白质有更大的结构复杂性，因为蛋白质只由 20 种不同的氨基酸组成。一个 HSPG 分子上能有太多形式的 HS 链，细胞能同时表达多种形式的 HSPG，每种都折叠成略有不同的形状，因此对细胞外蛋白质有不同的结合性质。

那么，毫无意外的就是 HSPG 能特异性地结合 70 多种细胞外蛋白质，其中一些在图 15.24 中列出。很多时候，特定配基的结合取决于 HS 链的精确糖基序列。HSPG 结合的功能可以分为三类，如图 15.25 所示。

一些结合硫酸类肝素蛋白多糖的蛋白质	
种类	结合蛋白
成形素	Wnt 蛋白
凝固	Xa 因子，凝血酶
ECM 成分	纤维蛋白，纤连蛋白，间隙胶原，层纤连蛋白，玻璃粘连蛋白
生长因子	表皮 GF，成纤维细胞 GF，类胰岛素 GF，血小板衍生 GF
组织改型因子	组织血纤维蛋白溶酶原激活子，血纤维蛋白溶酶原激活抑制子
蛋白酶	组织蛋白酶 G，嗜中性粒细胞弹性蛋白酶
生长因子结合蛋白（GF BP）	类胰岛素 GF BP，转化 GF BP
抗血管生成因子	血管增生抑制素，新生血管阻断剂
细胞粘连分子	选择素，神经细胞粘连分子（NCAM）
趋化激素	C-C，CXC
胞质分裂	白细胞介素-2，-3，-4，-5，-7，-12；干扰素 γ，肿瘤坏死因子-α
能量代谢	载脂蛋白 B 和 E，脂蛋白脂肪酶，甘油三酯脂肪酶

图 15.24　HSPG 结合很多细胞外蛋白，控制广泛的生物功能。这里是其部分结合蛋白的清单。改编自 Bernfield，M.，et al. *Annu. Rev. Biochem.* vol. 68. 1999。

HSPG 可以作为可溶性溶质如生长因子的复合受体，稳定生长因子和其信号受体的结合。这就有效地增加了生长因子在细胞表面的局部浓度，因此在给定剂量下增强反应。例如，这种相互作用在多配体聚糖、成纤维细胞生长因子（FGF）和 FGF 受体之间发生。

HSPG 能增加一些可溶性蛋白的内化，如低密度脂蛋白。

HSPG 能作为不溶性蛋白，如细胞外基质结构蛋白和细胞粘连受体的复合受体。这就帮助受体的细胞外部分和肌动蛋白细胞骨架之间建立了连接，因而保护了细胞间的完整性（由于与质膜连接的不牢固，磷脂酰肌醇蛋白聚糖不参与这第三种功能）。

HSPG 与其配基相互作用的生化证据来自大量体外结合测试和免疫共沉淀。这些研究十分复杂，事实上很难大量纯化出单一类型的 HSPG，它们广泛的转录后修饰使之

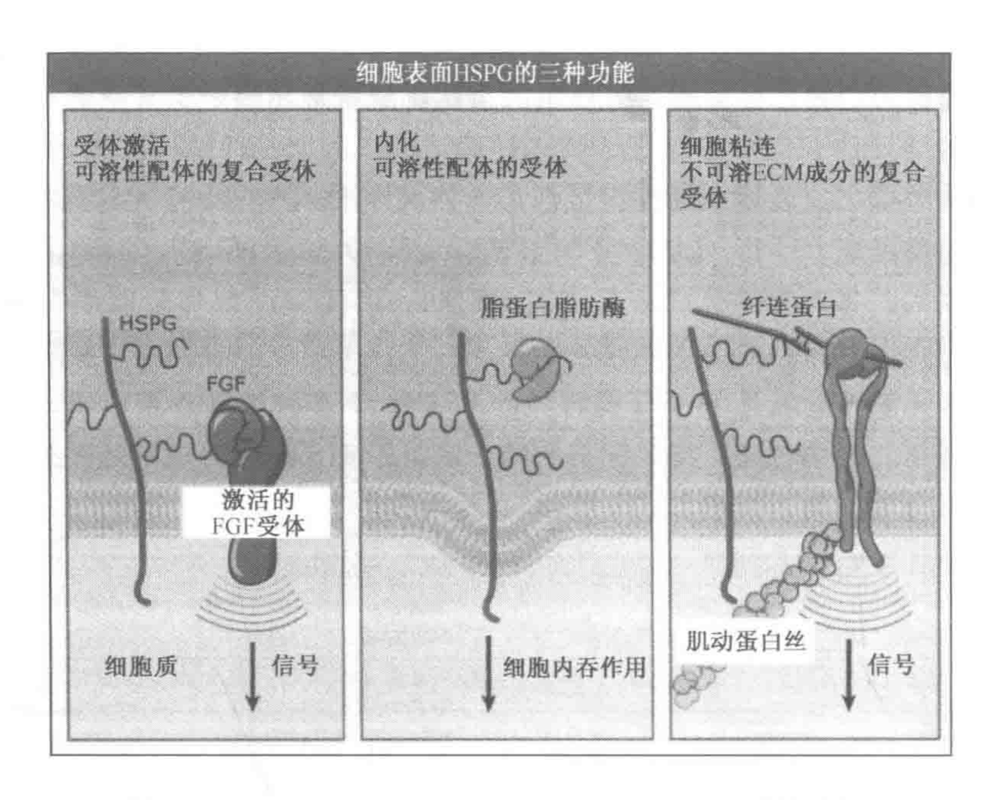


图 15.25　HSPG 是生长因子、酶和细胞外基质蛋白的受体。

很难在细胞中过表达。遗传分析是一项更有力的工具来阐明 HSPG 在发育和疾病中的功能。

遗传分析最好的模式生物之一是果蝇（*Drosophila melanogaster*）。为了研究 HSPG 在果蝇发育中的作用，研究者培育了 HSPG 核蛋白突变品系和 HS 合成所需糖的加工酶突变品系。这些果蝇和生长因子（或其受体）突变的果蝇有着相同的表型：联系受体的关键酶活性都发生了缺失。野生型生长因子受体拷贝的额外表达缓解了 HSPG 突变果蝇的症状，强有力地说明这两个表型是有关联的。类似的研究正在以小鼠为材料来进行。

15.11　基底膜是特化的细胞外基质

关键概念

- 基底膜是在上皮细胞层基面和神经肌肉连接处的细胞外基质薄层，至少由两个不同的层面组成。
- 基膜由基底膜连接到胶原蛋白纤维网络组成。
- 基底膜是上皮组织的支持网络、扩散屏障、可溶性蛋白（如生长因子）的集合位点、迁移神经元的引导信号。
- 基底膜的成分随组织类型不同而不同，但大多包含 4 种主要的细胞外基质成分：胶原蛋白Ⅳ、层粘连蛋白的片层以及将它们联合在一起的类肝素硫酸盐蛋白多糖和接头蛋白巢蛋白。

基底膜指的是胞外基质形成的薄片（或层状体），它与许多类型的相邻细胞接触。基底膜是细胞外基质的特殊形式，因为它包含胶原蛋白Ⅳ这样的独有蛋白，并且它呈片状排列。最初这一术语只用于形容上皮细胞基面接触的片状细胞外基质，电子显微镜也

是在这里首次观察到它的存在。现在，基底膜的主要成分已经得到了鉴定，我们也将这一术语应用于神经肌肉连接中神经和肌肉细胞之间的片层，因为这一片层与上皮细胞下的基底膜包含的蛋白有很多是相同的。

多年来细胞外基质片层有过很多名称。扫描电子显微镜观察发现基底膜是分隔两层细胞的独特片层。透射电子显微镜观察发现，基底膜分为两层，每层大约 40～60nm 厚。接近上皮细胞质膜的区域看起来近乎中空，称为明亮层；远离质膜的区域电子密度染色呈深色，叫做致密层（见图 15.56）。致密层之下是胶原蛋白纤维网络有时称为网状板；在光学显微镜下，基底膜和网状板看起来是一个界面，通常叫做基膜，如图 15.26。通常，基膜和基底膜这两个术语可以互换使用。

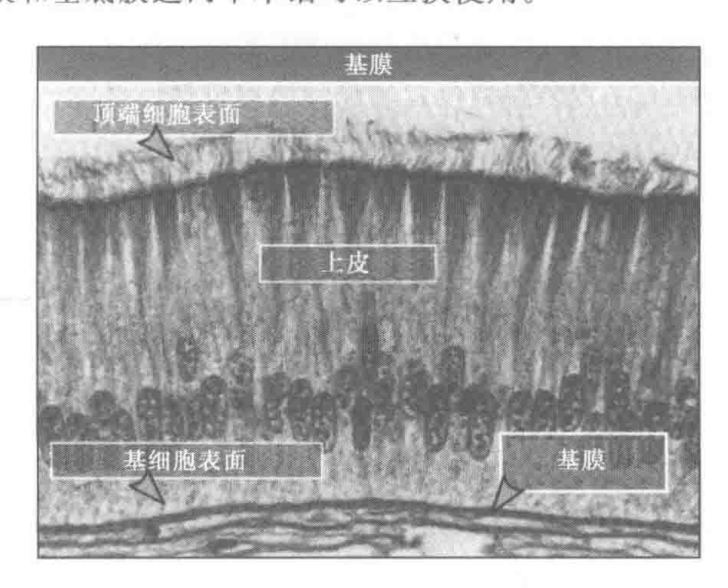


图 15.26 基膜是上皮细胞下面紧贴的一薄层蛋白质。照片由 William Bloom 博士和 Don W. Fawcett 博士惠赠。图片从 *A Textbook in Histology*，1986 复制。

基底膜执行四项基本功能：

它是上皮细胞层下面的结构基础。细胞通过一种叫半桥粒的特殊结构连接到基底膜的片层和胶原纤维上，半桥粒还连接到中间纤维网上（见 15.20 半桥粒连接上皮细胞和基底膜）。以这种方式，半桥粒连接了几种细胞的中间纤维网，加固了组织。这在皮肤这样强韧的器官中尤为普遍。

它是上皮细胞层之间的选择性透过屏障。基底膜上的蛋白多糖滤过颗粒性物质（死细胞、细菌等），因此辅助免疫系统防控感染。

基底膜上的蛋白多糖结合、固定、浓缩组织液中的可溶性配基（如生长因子）。这就增加了细胞的生长因子通路，并在一定程度上促进了生长因子受体的结合（见 15.8 蛋白多糖参与组织水合作用）。

基底膜中的层粘连蛋白是神经元生长锥发育的引导信号。这是神经元长突触寻找其细胞靶向的一种方式。

鉴于上述广泛的功能，基底膜的分子组成在不同组织中甚至有时在同一组织中变化巨大也就不奇怪了。分离这些组分是相当困难的，因为在大多数组织的细胞外基质中，基底膜所占的比例相当小。幸运的是，研究发现小鼠软骨肉瘤分泌大量的基膜蛋白，这使基底膜成分得以详尽分析。现在基底膜中有近 20 种蛋白质得到了鉴定。

几乎所有基底膜中都有四种基本成分。它们是胶原蛋白Ⅳ、层粘连蛋白、类肝素硫酸盐蛋白多糖、内功素（也称巢蛋白）（胶原蛋白、层粘连蛋白和类肝素硫酸盐蛋白多糖的细节见15.3胶原蛋白支撑着组织结构，15.6层粘连蛋白为细胞提供连接底物和15.10硫酸类肝素蛋白多糖是细胞表面复合受体）。现已有一种模型说明这些成分是如何编织在一起构成一个片状构型，形成基底膜的。

这个模型中，如图15.16，胶原蛋白Ⅳ和层粘连蛋白聚合形成网络。这些网络层层堆叠形成片层，并由桥连蛋白如类肝素硫酸盐蛋白多糖和内功素结合这些网络，将它们整合在一起。其他的成分（如层粘连蛋白-5）能结合半桥粒蛋白的Ⅶ型胶原蛋白纤维编织在片层之间。尽管有证据说明细胞通过整联蛋白受体的接触对完整基底膜的组装有一定作用，而这些额外的蛋白与基本成分的作用尚不清楚。一旦组装起来，基底膜就形成紧密复杂的编制网络，为上皮组织提供足够的结构稳定性，并能作为细胞外液体的渗透选择性过滤器。

15.12 蛋白酶降解细胞外基质成分

关键概念

- 作为发育和创伤愈合的正常组成部分，细胞必须定期降解更换细胞外基质。
- 细胞外基质蛋白由特殊的蛋白酶降解，这些酶是细胞以非活化形式分泌的。
- 这些蛋白只在需要的组织中激活。激活通常是由蛋白酶对前肽进行水解切割。
- 基质金属蛋白酶（MMP）家族是这些蛋白中最丰富的家族之一，能降解所有主要的细胞外基质蛋白。
- MMP可以通过剪切前肽彼此激活，这会导致蛋白酶激活的级联效应，进而导致细胞外基质蛋白的快速降解。
- ADAM是降解细胞外基质的又一类蛋白酶，这些蛋白酶也能结合整联蛋白细胞外基质受体，从而帮助调控细胞外基质的组装和降解。
- 细胞分泌这些蛋白酶的抑制因子，保护自身不受非必要的降解。
- 基质金属蛋白酶-2基因的突变造成很多人类骨骼异常，反映出发育过程中细胞外基质重塑的必要性。

本章中，我们已经讨论了细胞外基质分子在调控多细胞生物细胞行为方面的关键作用。但是生物也产生蛋白酶破坏细胞外基质。为什么生物想要除去将它们组织起来的分子呢？最简单的答案是：像细胞一样，胞外基质具有可塑性，能对环境条件的变化做出反应。例如，发育过程中的神经元外基质可能不足以支持完全分化后的神经元，因此一旦神经元成熟就会被替换。或者早期发育时在手指或脚趾间形成蹼的细胞外基质在后期就不再需要了，因此就会被完全去除。除此之外，受伤和感染也对组织造成了很大的伤害，在创伤愈合期间，受损部分有时会被降解，新成分会加以填补。最终，细胞外基质蛋白的蛋白酶产生的肌动蛋白小肽促进了细胞迁移，从而刺激了创伤的修复。这些小肽也能刺激肿瘤细胞迁移。最终，细胞外基质的消化有时产生一些有用的化合物，比如生长因子和荷尔蒙，它们是从前细胞外基质大蛋白形成的网络固定下来的。细胞外空间蛋白水解可能的靶点范围如图15.27。

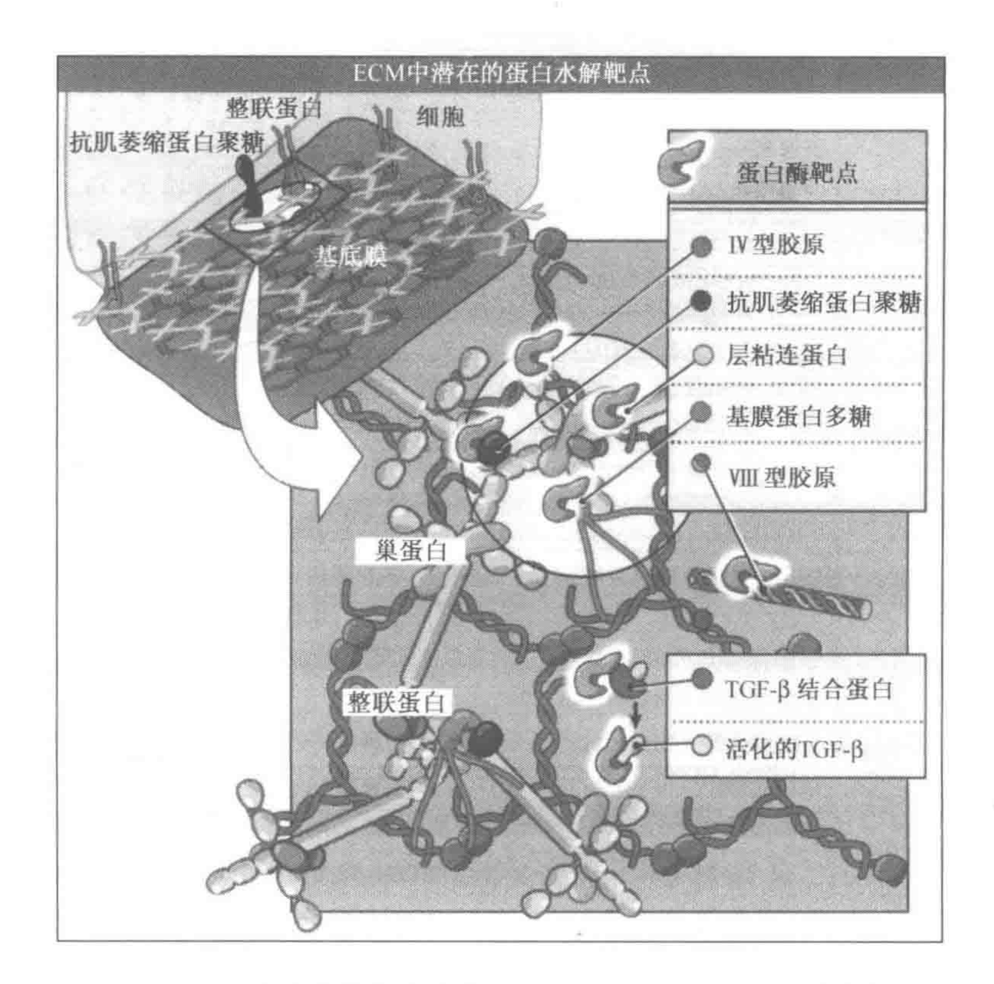


图 15.27　ECM 中胞外蛋白酶的几个可能靶点。有时 ECM 蛋白的消化会释放有功能活性的片段。

如同我们设想的那样，细胞产生的蛋白酶就像需要降解的胞外蛋白一样多。许多种细胞向胞外空间分泌几十种蛋白酶，其中大多能在血流中自由循环。潜在的危险当然是这些蛋白酶能结合、降解完全健康的正常组织。因此，其中很多都以非激活形式分泌，只在需要的组织中激活。这样，对健康组织的任意结合就不再是个问题了。想象蛋白酶是一把折叠刀，正常情况下折叠成手柄藏起刀刃；只有需要的时候才暴露刀刃，小刀能一直被用到磨损或者被另一个物体（对蛋白酶来说就是抑制分子）卡住。

细胞外基质蛋白酶有两个主要的家族：**基质金属蛋白酶（MMP）**和 ADAM（一种解聚素和金属蛋白酶）家族。当两个家族共同降解细胞外基质蛋白时，ADAM 蛋白酶也支持基于整联蛋白的细胞粘连。

人类身上至少已经识别了 20 种 MMP，基于结构和底物特异性，它们可以分为六组，如图 15.28 所示。

所有的 MMP 蛋白具有一些共同的特征，如图 15.29 所示：

信号肽引导蛋白酶从合成它们的细胞中分泌出来。

催化域中有高度保守的锌离子结合位点。

N 端前肽起着折叠小刀比喻中“手柄”的作用：蛋白的这一部分折叠起来，与催化位点的锌离子形成共价键，因此抑制了蛋白酶的活性。这一前肽被弗林蛋白酶或相关酶剪切，蛋白酶被激活。

酶	胞外基质蛋白酶	底物举例
胶原酶	胶原酶-1 胶原酶-2 胶原酶-3	• 胶原Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅶ，Ⅷ，Ⅹ • 胶原Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ • 聚集蛋白聚糖，胶原Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ，Ⅸ，Ⅹ，ⅩⅣ；纤连蛋白，明胶，层粘连蛋白
明胶酶	明胶酶 A 明胶酶 B	• 胶原Ⅰ，Ⅳ，Ⅴ，Ⅶ，Ⅹ；明胶，纤连蛋白 • 胶原Ⅳ，Ⅴ，Ⅶ，Ⅺ、ⅩⅣ；弹性蛋白，明胶
膜型 MMP	MT1-MMP（MMP-14） MT1-MMP（MMP-15） MT1-MMP（MMP-16） MT1-MMP（MMP-17） MT1-MMP（MMP-24） MT1-MMP（MMP-25）	• 聚集蛋白聚糖，胶源Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ；凝胶，巢蛋白，纤维蛋白，层粘连蛋白，基膜蛋白多糖，玻璃粘连蛋白 • 聚集蛋白聚糖，巢蛋白，纤连蛋白，层粘连蛋白，基膜蛋白多糖 • 软骨，胶原Ⅲ，纤连蛋白，明胶，层粘连蛋白 • 明胶 • 未确定 • 未确定
基质降解酶	基质降解酶-1 基质降解酶-2	• 聚集蛋白聚糖，胶原Ⅳ，Ⅴ，Ⅸ，Ⅹ；弹性蛋白，巢蛋白，纤连蛋白，胶原，层粘连蛋白 • 与 MP3 相同
类基质降解酶 MMP	基质降解酶-3 基质溶解因子 金属弹性蛋白酶	• 丝氨酸蛋白酶抑制剂 • 胶原Ⅳ，弹性蛋白，巢蛋白，纤连蛋白，层粘连蛋白 • 胶源Ⅳ，弹性蛋白，明胶，纤连蛋白，层粘连蛋白，玻璃粘连蛋白
其他 MMP	MMP-19 Enamelysin（MMP-20） MMP-23 MMP-26	• 明胶 • 釉基质 • 合成 MMP 底物 • 明胶，合成 MMP 底物

图 15.28　人类 6 种基质金属蛋白酶。改编自 Ravanti，L.，and Kähäri，V-M. Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int. J. Molec. Med.* 2000. 6：391。

血红素蛋白结构域，决定蛋白酶的底物特异性。

富含脯氨酸的“铰链”区域，连接催化结构域和血红素蛋白结构域。

跨膜型的 MMP 还在羧基端包含跨膜片段，将蛋白锚定在质膜上。

MMP 家族的蛋白酶组合在一起能消化本章中提到的所有细胞外基质糖蛋白和几种蛋白多糖。很多情况下，MMP 以组合的方式共同发挥作用。尤其有趣的是它们能通过剪切前肽彼此激活。例如 MMP-3 能激活 MMP-7，MMP-7 又能顺序激活 MMP-2。这就使多种底物能快速降解。比如，MMP-2，-3，-7 的联合作用能消化十几种不同的细胞外基质蛋白。通常，蛋白水解的级联反应起始于在降解位点上捕获已活化的蛋白酶。比如在创伤愈合过程中，蛋白酶中的纤溶酶是在凝血中激活，它又激活凝块附近的 MMP，起始组织重塑的过程。

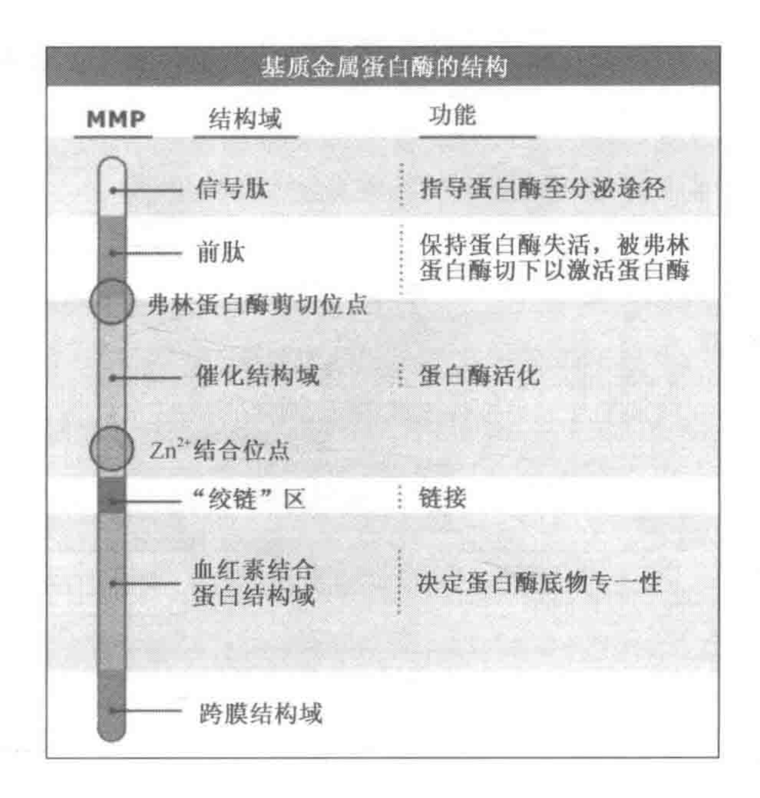


图 15.29 所有 6 种基质金属蛋白酶具有共同的结构性质。以一种 MMP 来显示 MMP 家族的相对特征位点。一些 MMP 缺乏这些特征中的一种或几种，但所有的 MMP 都有前肽和催化结构域。

ADAM 家族在不同物种中包含近 30 种不同的蛋白酶，其中 15 种含有 MMP 家族和很多其他蛋白酶中发现的保守锌离子结合催化位点。ADAM 家族也包括前肽，如同 MMP 中一样，其功能也是对催化位点起抑制作用。ADAM 家族能降解多种细胞外蛋白，包括细胞外基质蛋白。它们还包含一个在解聚素类蛋白中被发现的结构域。解聚素能结合血小板上主要的整联蛋白受体，在凝血过程中抑制血小板的聚集。ADAM 中的解聚素结构域有可能作为整联蛋白的底物，从而允许细胞间的粘连。因此，ADAM 的功能是相当广泛的，它们也作为细胞外基质结构完整性的调节剂。

MMP 和 ADAM 都能被一类已知的可溶性蛋白，金属蛋白酶组织抑制剂（TIMP）所抑制。细胞分泌 TIMP 以保护自身（和周围的基质）不被活化的蛋白酶降解。有时，细胞分泌胞外基质蛋白和降解它们的蛋白酶及其抑制剂，从而在基质组装和降解之间建立了一个高度敏感的平衡，如图 15.30 所示。这一系统失去平衡时，如在肿瘤中，组织就被快速地降解，肿瘤细胞就更容易离开原来的部位进入循环系统。为此，TIPM 正在作为潜在的抗癌药物进行广泛的研究。

因为细胞利用整联蛋白受体结合多数细胞外基质蛋白，这些蛋白的消化可能对整联蛋白介导的功能，如粘连、迁移和信号转导有重要的影响（见 15.13 *大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体*）。有时，细胞外基质分子的消化会导致有功能活性的蛋白水解片段释放出来，这些片段最初被遮蔽在完整的分子之中。例如，有一个通行的模型，如图 15.31 所示，很多细胞通过 $\alpha_2\beta_1$ 整联蛋白对原纤维胶原蛋白的吸附诱导 MMP-1 的表达。这种蛋白酶能消化胶原蛋白，暴露新的结合位点，如 Arg-Gly-Asp（RGD）序列，再结合另一个整联蛋白受体 $\alpha_v\beta_3$。$\alpha_v\beta_3$ 的结合依次激活了一个信号通路并将 MAP

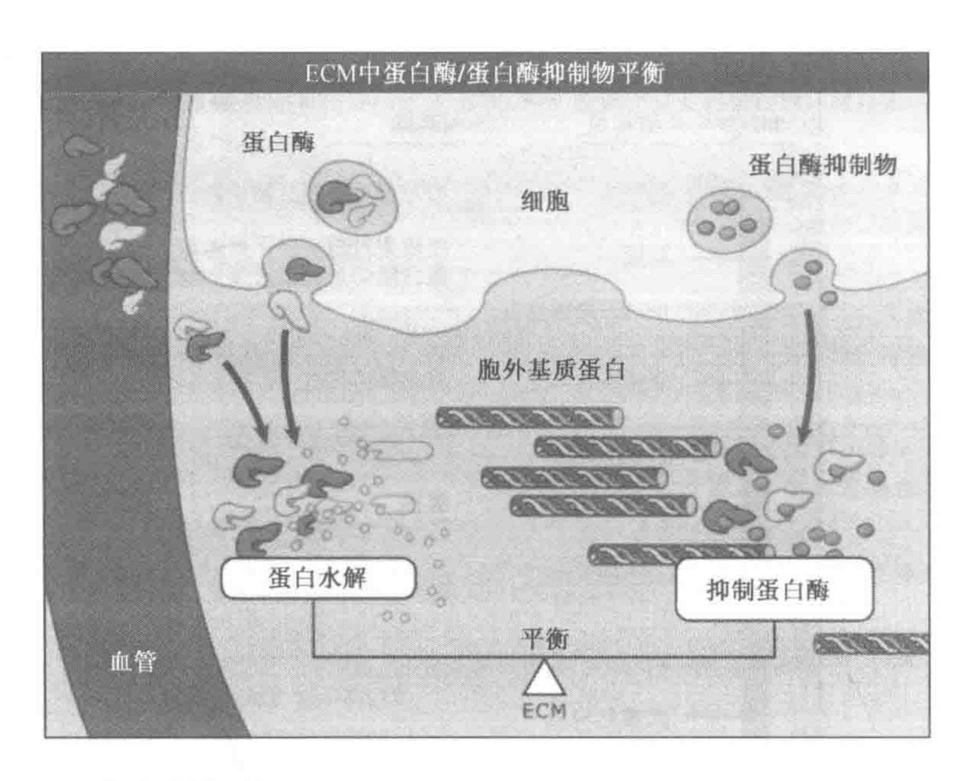


图 15.30　细胞分泌蛋白酶来消化细胞外基质蛋白，也分泌蛋白酶的抑制物抑制这一降解。这就使组织内细胞外基质的降解和重塑达到完全平衡的控制。

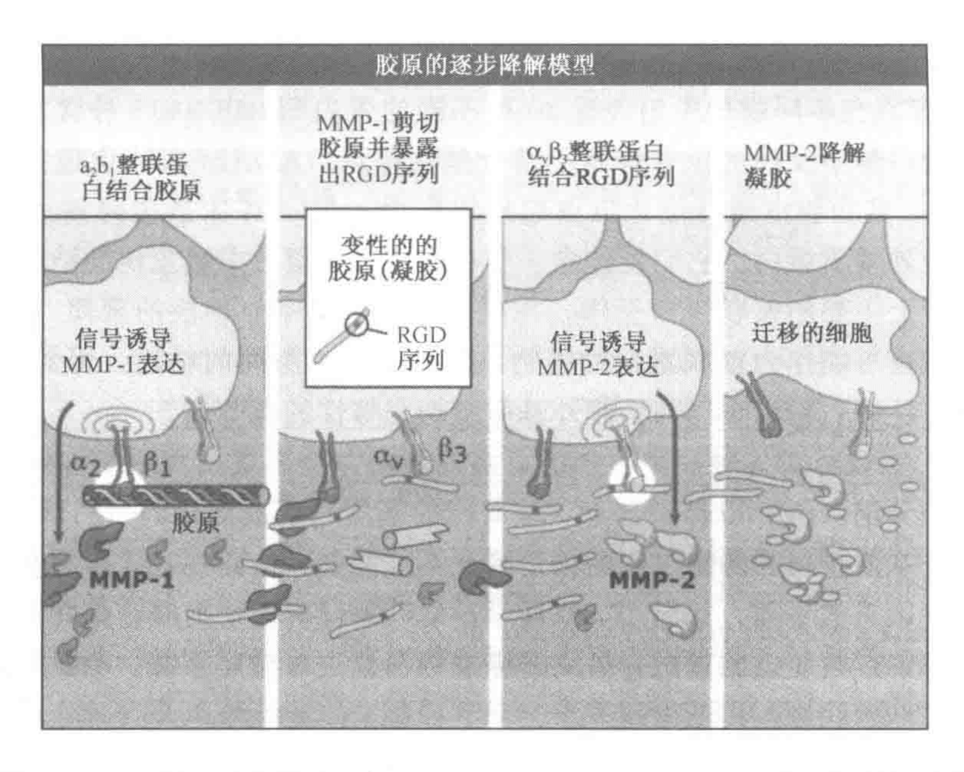


图 15.31　在胶原蛋白降解的模型中，细胞开始通过 $\alpha_2\beta_1$ 整联蛋白受体结合胶原蛋白。MMP-1 的消化改变了胶原蛋白的结构，暴露了 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白结合位点。通过 $\alpha_v\beta_3$ 的吸附诱导 MMP-2 的表达，进一步降解胶原蛋白。

激酶激活，导致 MMP-2 表达的增加。释放后的 MMP-2 再被 MMP-1 激活，完成对胶原蛋白纤维的降解。这一步不仅为细胞去除了胶原蛋白吸附层，也释放出胶原蛋白片段，由此刺激细胞从胶原蛋白纤维的降解处迁移出来。

关于 MMP 重要性的一个引人注目的例子是遗传性的“骨质溶解”症，又叫 Winchester 综合征、Torg 综合征、小结节-关节-骨质溶解综合征和 Al-Aqeel-sewairi 综合征。患病的个体呈现出与骨质流失相关的严重骨骼问题，包括腕骨和踝骨质的吸收、关节炎致残病变、严重骨质疏松、特异性的面部异常。这些遗传疾病的来源是 MMP-2 基因突变的常染色体隐性遗传，导致活性 MMP-2 产物的缺失。

15.13 大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体

关键概念

- 事实上，所有的动物细胞都表达整联蛋白，整联蛋白是最丰富、最广泛表达的细胞外基质蛋白受体。
- 一些整联蛋白和其他的跨膜蛋白相互作用。
- 整联蛋白由两个独立的亚基构成，α 链和 β 链。两链的细胞外部分都能结合细胞外基质蛋白，胞质部分都能结合细胞骨架和信号蛋白。
- 脊椎动物有很多种 α、β 亚基，联合起来至少能形成 24 种不同的 αβ 异二聚受体。
- 大多数细胞表达不止一种整联蛋白受体，细胞表达的受体类型随时间或不同的环境条件而改变。
- 整联蛋白受体在多种细胞外基质蛋白中结合特异性的氨基酸序列，所有已知序列都至少包含一个酸性氨基酸。

细胞通过特异性受体结合胞外基质蛋白。**整联蛋白**家族是这种受体中已知最多的类群。整联蛋白结合细胞外基质蛋白，有时结合其他细胞表面表达的膜蛋白。事实上所有的动物细胞都表达整联蛋白受体。整联蛋白是将组织结合在一起的最主要的细胞表面蛋白（见 15.15 整联蛋白和细胞外基质在发育过程中扮演重要角色）。整联蛋白将细胞外基质和胞内信号蛋白以及细胞骨架联系在一起（见 15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导）。

为了理解整联蛋白如何发挥功能，我们需要知道它们的结构组织。整联蛋白受体由两段不同的多肽组成，称为 α 亚基和 β 亚基，它们为单次跨膜，由非共价连接形成异二聚受体。基于几项实验数据，包括整联蛋白受体的 X 射线晶体分析，整联蛋白结构的一个详尽的综合模型已经浮出水面，如图 15.32 所示。每个亚基都有几个结构域参与完整受体的功能。对 α 链来说，这些结构域包括一个叫 β 螺旋桨的结构，位于亚基的 N 端蛋白的胞外部分。螺旋桨包括 7 个 60 氨基酸重复序列形成螺旋桨的叶片，外加 3～4 个基序称为 EF 臂，能结合二价阳离子，如钙离子。一些 α 亚基有额外的结构域，称为 Ⅰ 结构域或 A 结构域，能和 β 亚基中 Mg^{2+}/Mn^{2+} 金属离子依赖的吸附位点（MIDAS）作用。α 亚基在靠近质膜的位置包含 3 个结构域，共同组成“腿”的结构，分别叫做 thigh 结构域、calf1 结构域、calf2 结构域。所有的 β 链都有保守的 N 端 PS-Ⅰ 结构域，连接一个杂合结构域，又进一步连接到球形结构域 Ⅰ/A，进而连接 α 链的 β 螺旋桨。β 链靠近膜的区域包含 3 个重复结构域，类似于表皮生长因子的结构（EGF 域），随后是 β 尾结构域。最后，αβ 链都包含单个跨膜结构域和 C 端的短胞质结构域。

脊椎动物中现已知有 18α 和 8β（大多数是连续编号，一些还加有字母编号反映它

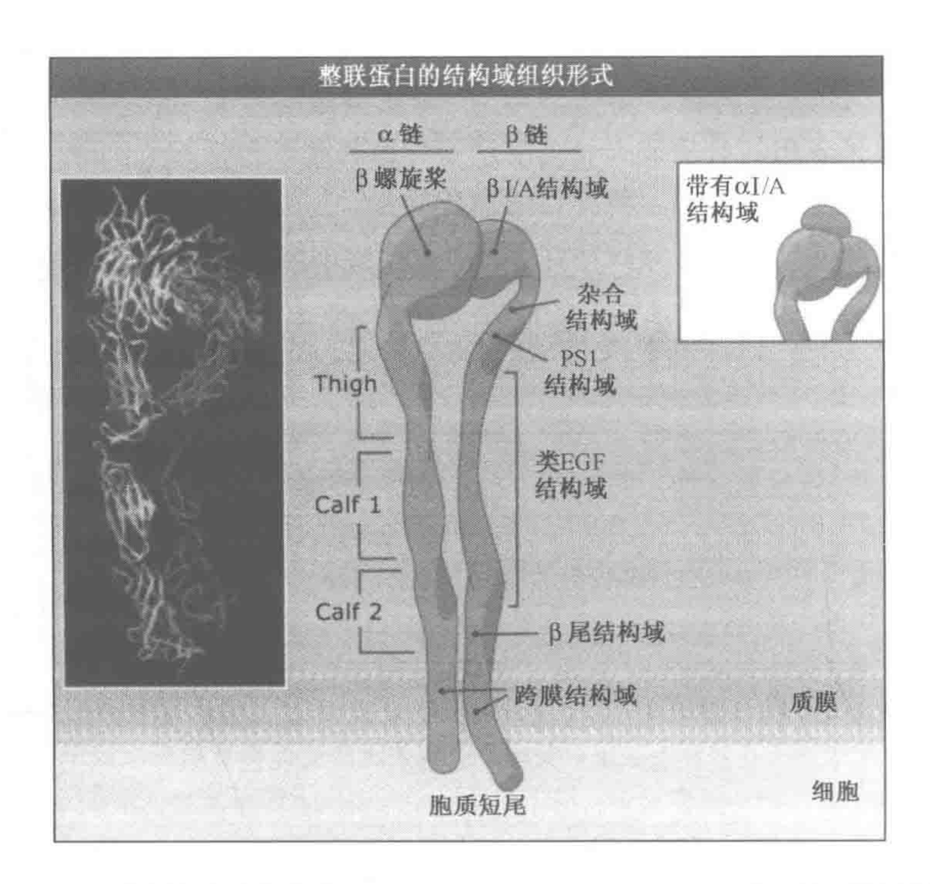


图 15.32　整联蛋白受体是异二聚体。一些 α 链包含 α-Ⅰ/A 结构域，连接到受体胞外部分的螺旋桨结构域。大多数整联蛋白受体缺乏 α-Ⅰ结构域。图中表示了 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白胞外结构域的晶体结构拉伸模型。照片经许可复制自 Xiong, J. P, et al. 2001. *Science*. 294：339-343。© 2001 AAAS。

们的识别方式)。这 26 种亚基相互作用，形成至少 24 种不同的 αβ 受体复合体。除此之外，一些亚基的多样性来自于不同的剪切产生的更加多样的亚基组成。大多数细胞表达不止一种整联蛋白受体，表达受体的类型在发育过程中或对特异信号应答时发生变化。

为什么有这么多的整联蛋白？一些整联蛋白亚基的遗传敲除对于正在发育的生物是致死性的，而其他整联蛋白的敲除显示出温和一些的效应，说明一些受体可能彼此补偿。这种补偿的能力叫做功能冗余（细节见 15.15 整联蛋白和细胞外基质在发育过程中扮演重要角色)。

整联蛋白基于 β 亚基分为 3 个亚家族，如图 15.33 所示。β_1 整联蛋白主要结合细胞外基质蛋白，至今是最广泛表达的整联蛋白。β_2 整联蛋白只在白细胞中表达，其中一些结合到其他细胞的表面蛋白上。一些 β_3 整联蛋白是血小板和巨核细胞（血小板前体细胞）表达的，在血小板吸附和凝血过程中发挥关键的作用。另一些 β_3 整联蛋白是内皮细胞、成纤维细胞和一些肿瘤细胞表达。包含 β_4-β_8 的受体相当稀少多变，因此没有将它们归入任何亚群。

为什么整联蛋白支持细胞吸附？整联蛋白受体通过 αβ 链的胞外结构域直接结合细胞外基质蛋白。α 链的胞外结构域被认为是给大多数整联蛋白受体提供了配基特异性。除了纤连蛋白受体 $\alpha_5\beta_1$，所有的整联蛋白都能结合不止一种配基。每种细胞外基质蛋白也能结合不止一种整联蛋白。尽管不能由配基的氨基酸序列预测整联蛋白的结合位点，

三类整联蛋白受体			
分类		配体	定位/功能
	α_1	胶原，层粘连蛋白	
	α_2	胶原，层粘连蛋白	细胞外基质
	α_3	纤连蛋白，层粘连蛋白，血小板反应素	
	α_4	纤连蛋白	
		血管细胞粘连分子-1	细胞-细胞粘连
	α_5	胶原，纤连蛋白，	细胞外基质
		纤维蛋白原	血液凝固
β1	α_6	层粘连蛋白	
	α_7	层粘连蛋白	
	α_8	腱生蛋白/tenasin，纤连蛋白	细胞外基质
	α_9	腱生蛋白/tenasin	
	α_{10}	胶原	
	α_{11}	胶原	
	α_D	细胞间粘连分子-3，血管粘连蛋白-1	细胞-细胞粘连
	α_L	细胞间粘连分子 1-5	
β2	α_M	C3b，	宿主防御
		纤维蛋白原，X 因子，	血液凝固
	α_X	胞间粘连分子-1	细胞-细胞粘连
		纤维蛋白原，	血液凝固
		C3b	宿主防御
	α_{Ib}	胶原	细胞外基质
	α_{II}	胶原，纤连蛋白，血小板反应素，玻璃粘连蛋白	
β3		纤维蛋白原，von willebrand 因子，血纤维蛋白溶酶原，凝血素	血液凝固
	α_v	胶原，纤连蛋白，层粘连蛋白，骨桥蛋白，血小板反应素，玻璃粘连蛋白	细胞外基质
		解聚蛋白，纤维蛋白原，凝血素，von willebrand 因子	血液凝固
		基质金属蛋白酶-2	蛋白酶

图 15.33　整联蛋白根据 β 亚基分成亚类。

一种酸性氨基酸（如天门冬氨酸）对所有已知的细胞外基质蛋白结合位点都是普遍需要的。很多配基，如胶原蛋白、玻璃粘连蛋白、纤连蛋白都含有序列精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸（RGD）（具体例子见 15.4 纤连蛋白将细胞与成胶原基质相连）。下一节我们将会看到整联蛋白的吸附功能也牵涉胞质尾部，它能结合细胞骨架和信号转导蛋白。

15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导

关键概念

- 整联蛋白是信号受体，控制细胞结合胞外基质蛋白以及吸附后的细胞内反应。
- 整联蛋白没有自己的酶活性，它们和接头蛋白相互作用从而与信号蛋白相连接。
- 两个过程，亲和力调整（改变单个受体的结合力）和亲合性调整（改变受体的聚集）调控整联蛋白结合细胞外基质蛋白的力度。
- 受体亚基胞质尾部的变化或胞外阳离子浓度的变化导致了整联蛋白受体的构象变化，这种构象变化是两种调整的核心。
- 在膜内面向外的信号转导中，受体构象的变化是由细胞内起源于别处（比如另一个受体）的内部信号引发的。
- 在膜外面向内的信号转导中，受体起源的信号（比如在配基结合下）被传播到细胞的其他部位。
- 整联蛋白相关的胞质蛋白聚集情况取决于整联蛋白类型及结合的胞外基质蛋白类型，导致细胞对整联蛋白的外面向内信号的反应也相应变化。
- 很多整联蛋白信号通路和生长因子信号通路重叠。

整联蛋白受体与细胞外基质蛋白的结合可以随环境信号发生改变。为什么这一点很有意义？比如考虑血小板在血液中的循环。它的主要功能是形成凝血块填补受伤组织的缺口。为了实现这一目的，血小板结合细胞外基质蛋白和凝血蛋白。血小板在未损坏的血管区域不能起始凝血块形成。血小板（和其他细胞）对胞外蛋白的吸附由整联蛋白受体控制。另一个例子是结合力的调整使细胞在稳定状态下紧密吸附胞外蛋白，而在移动时放松对这些蛋白的控制。

有两种补偿机制控制整联蛋白的结合程度，如图 15.34 所示：

亲和力调整，受体构象的变化导致对其配基亲和力的改变。

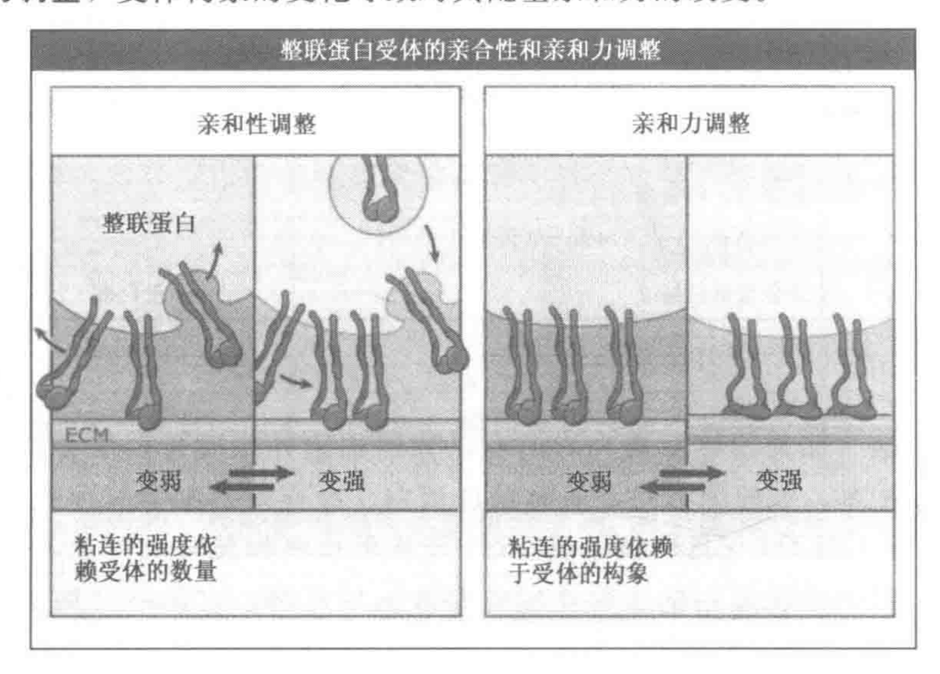


图 15.34 亲合性调整倾向于细胞表面受体密度的变化，亲和力调整倾向于单个受体蛋白结合力的变化。

亲合性调整，其中整联蛋白和胞外基质蛋白作用的数量变化。

细胞内信号通路能控制整联蛋白构象的加工和变化，这对两种调整都是很重要的。

基于整联蛋白受体的 X 射线晶体分析，整联蛋白激活的模型已经被提出，如图 15.35 所示。在非激活形式，αβ 链的胞外部分向着质膜方向弯曲，受体不结合配基。Thigh 结构域和杂和结构域分别是 αβ 亚基的枢纽。整联蛋白的激活要求受体的胞外部分拉直，受体越直对配基的亲和力越大。在拉直过程的某一时刻，受体以低亲和力结合配基，配基的结合可辅助受体的进一步拉直。受体三维构象的进一步变化可被二价阳离子（结合于受体的 β 螺旋桨或 MIDAS 区）的局部浓度变化或细胞信号反应所触发。这一模型最重要的一点是说明了整联蛋白如何接纳许多不同的形状，因而有许多不同的结合位点。这个模型帮助解释了细胞如何能调整对细胞外基质蛋白的结合。

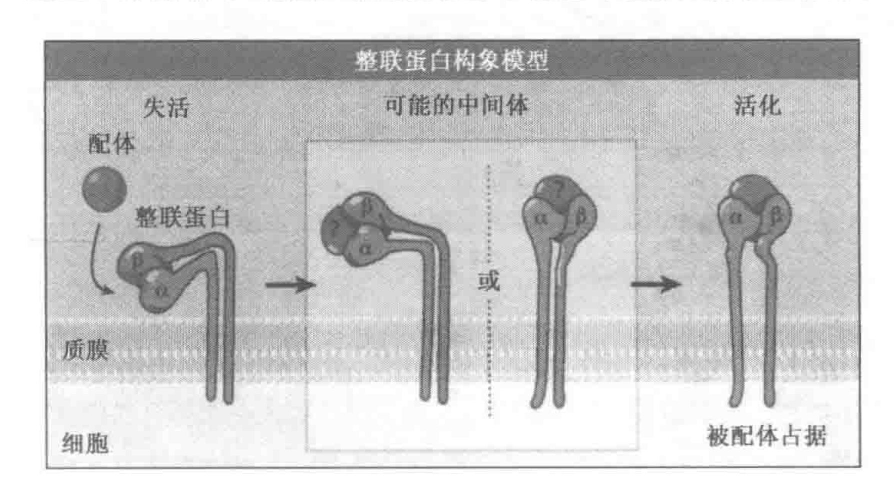


图 15.35　在这个整联蛋白激活的模型中，非活化受体的胞外部分向着质膜折叠。随着整联蛋白受体的拉直，它结合配基被活化。完全拉直的形式对配基有最高的亲和力。

胞外液体中二价阳离子的浓度可以改变，这是维持体内盐平衡的一部分。由于整联蛋白结合 Ca^{2+} 和 Mn^{2+}，这一变化能够改变它们的构象，因而影响对胞外蛋白的结合(见 15.13 *大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体*)。最典型的例子是在体外检测中，阳离子的去除导致受体的折叠和吸附力丧失，而增加阳离子通过拉直受体可恢复其吸附力。

整联蛋白功能的调整也发生在其他受体起始的信号应答中，如生长因子受体。这就是“膜内面向外”的信号，如图 15.36 所示。信号在细胞质中传播，在整联蛋白亚基的胞外端终止。膜内面向外信号中整联蛋白的生化变化目前还不能解释。

上述激活的结果是，整联蛋白受体胞外部分的拉直导致细胞质尾部形状的相应变化。这一跨膜形状的变化是信号转导的重要部分，因为它影响整联蛋白和细胞溶质蛋白的相互作用。整联蛋白受体胞质尾部根据胞外条件变化和膜内面向外信号而发生构象变化的两个模型如图 15.37 所示。一个是模型基于纯化整联蛋白的晶体结构，说明激活导致胞质尾段的展开，就像开启一把剪刀一样。这将允许胞内信号分子的结合。在非激活态，整联蛋白是关闭的构象，信号分子不结合。

另一个模型如图 15.37 所示，是基于 NMR 结构。它说明，与受体细胞外部分发生的情况类似，当受体非激活时，整联蛋白 α 亚基的胞质尾端自我折叠成环，在活化时解折叠。这一解折叠允许信号蛋白的结合。

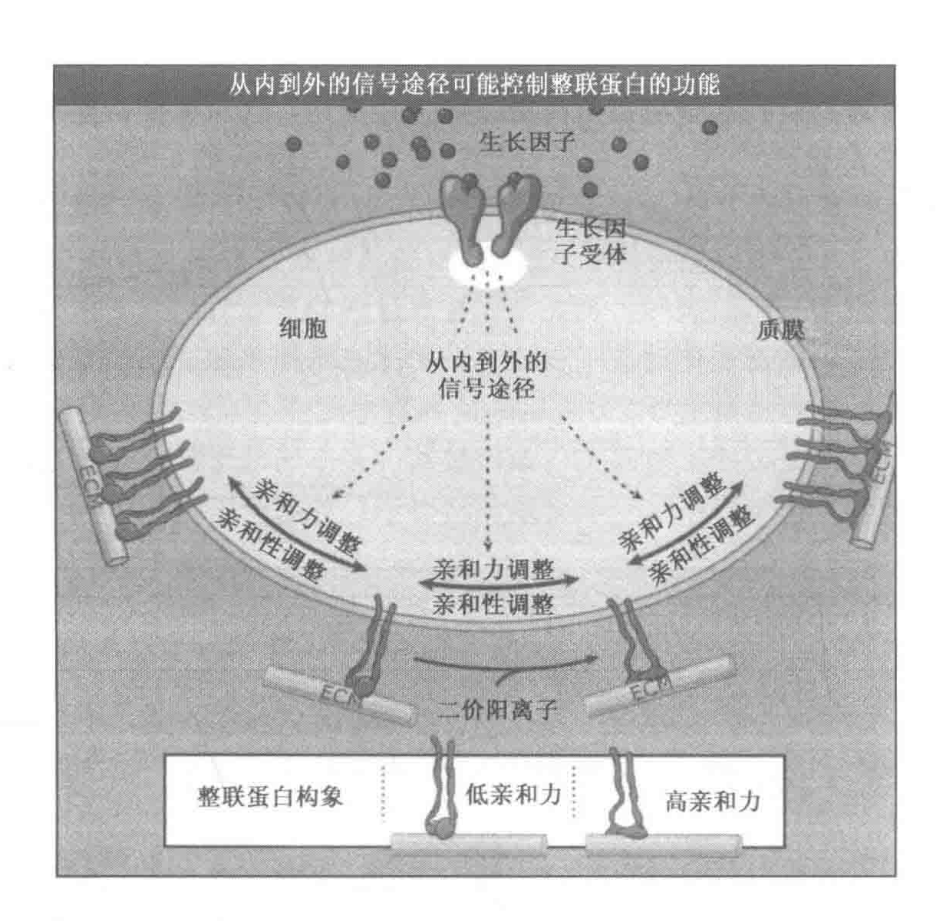


图 15.36 细胞质中起始的信号（如生长因子信号）传播到整联蛋白受体的胞质部分。这些信号导致细胞表面整联蛋白的亲和力或亲合性调整。因此信息是由膜内面向外传递的，从胞质到胞外空间。

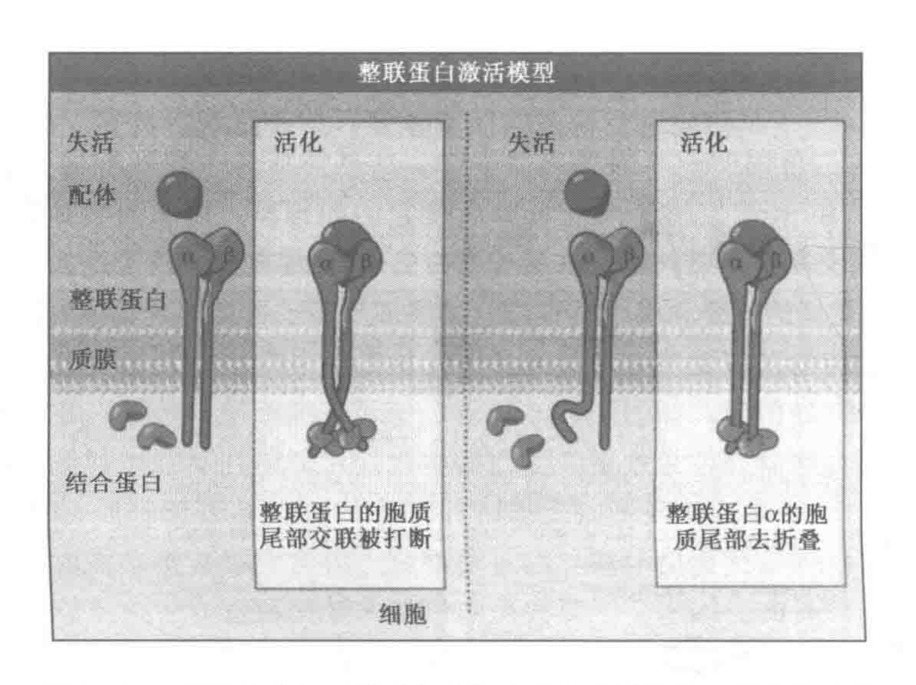


图 15.37 整联蛋白激活并结合胞外配基以及暴露胞内蛋白结合位点的两个模型。活化信号本身可以是胞内的也可以是胞外的。

在亲合性调整的过程中，整联蛋白受体激活后，在细胞表面的聚集增加，如图 15.34 所示。个别整联蛋白在细胞表面广泛分布，与其底物形成较弱的键。然而，如果

是相同数目的整联蛋白在膜平面散播在细胞表面成簇存在，它们形成的高密度键就更经得住张力。因此，受体的数量和亲和力不变化时，广泛分布的受体比成簇存在的受体相比其支持附着的力要弱。

当整联蛋白受体聚集在细胞表面，αβ 亚基的胞质尾端是各种蛋白组装的对接位点，它们有两个功能。首先，它们通过整联蛋白在细胞外部和细胞骨架成分之间建立起连接，如图 15.38 所示。这样，拉力就贯穿细胞分布到胞外基质之中。在半桥粒中，$\alpha_6\beta_4$ 整联蛋白连接到中间纤维网上（见 15.20 半桥粒连接上皮细胞和基底膜）。与此不同的是，$\beta_1\beta_2\beta_3$ 整联蛋白附近的组装蛋白将整联蛋白连接到肌动蛋白细胞骨架上，使细胞能改变形状并实施其他活动，如迁移和细胞分裂（见第 8 章肌动蛋白）。

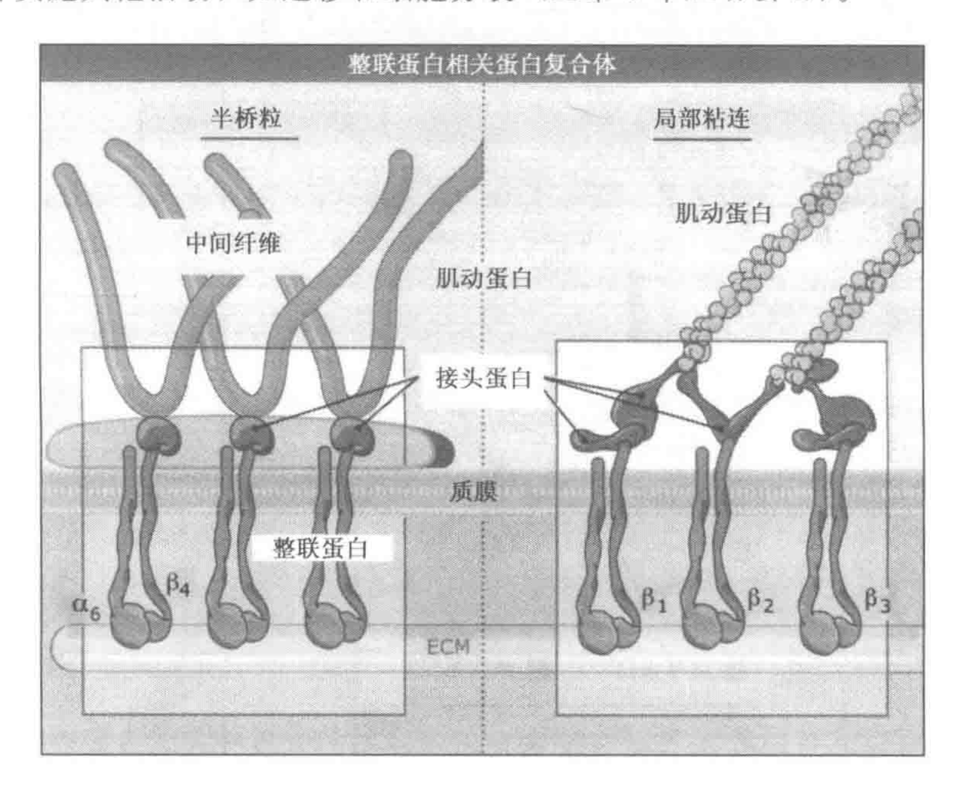


图 15.38　半桥粒和局部粘连是结构与功能迥异的整联蛋白相关蛋白复合体。

培养细胞中整联蛋白的每个激活和聚集位点都有一群胞内蛋白结合在整联蛋白上形成局部粘连，它们是细胞表面可鉴别的斑，可介导与底物的接触或粘连。细胞一旦和胞外基质发生作用，整联蛋白受体的聚集就非常迅速，聚集体称**局部复合体**。由于局部复合体会募集其他胞质蛋白参与聚集，它们成熟形成局部接触或**局部粘连**。

第二，这里的蛋白可以作为信号蛋白组装的脚手架分子。整联蛋白受体本身不是信号蛋白。它们是一些蛋白质三维排列的结构基础，这些蛋白将整联蛋白结合的变化翻译成化学信号快速传播到整个细胞。由整联蛋白结合聚集触发的细胞内信号叫做膜外面向内信号。整联蛋白构象变化的模型如图 15.37 所示，也可以用在膜外面向内信号中。

由于信号蛋白之间没有稳定联系，它们的识别变得相当困难。酵母双杂交方法已经被用于识别与整联蛋白胞质尾部相互作用的蛋白（见GNTC：15-0001）。这些蛋白在信号复合体中的存在和功能之后用其他技术测定。

现在至少有 24 种与整联蛋白聚合体整合的胞质蛋白已经被鉴定出来。每种聚合体的精确成分取决于聚合体中整联蛋白的类型、整联蛋白结合的细胞外基质类型、聚合体

上施加的张力、聚合体在细胞中的位置和形成聚合体的细胞类型。因此，不能勾勒出“典型”的整联蛋白相关信号复合体的形状。

有一个局部粘连的例子，它们是相对稳定的结构，支持细胞和胞外基质的粘连，也是能在细胞外基质作用下激活的信号复合体。这样的信号复合体既包括结构蛋白，形成后连接肌动蛋白细胞骨架，又包括信号蛋白，包括多种蛋白、脂类激酶以及控制它们功能的调节蛋白，如图 15.39 所示。一些结构蛋白包括踝蛋白、α 肌动蛋白和能结合肌动蛋白丝的纽蛋白。复合体中不是所有蛋白都能直接结合整联蛋白。蛋白之间的作用是通过纯化整联蛋白和胞质蛋白的亲和色谱以及这些蛋白分离部分的结合测试确定的。

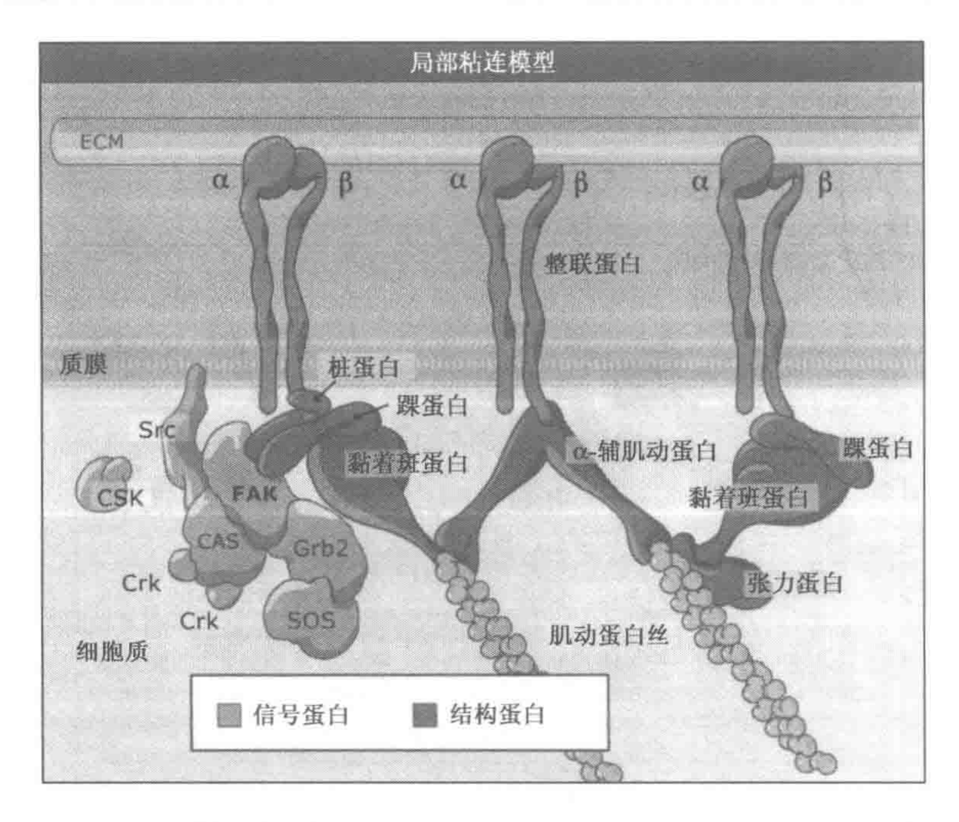


图 15.39 局部粘连在细胞表面整联蛋白聚合体周围形成，是细胞外基质和肌动蛋白细胞骨架之间的结构连接。局部粘连中还发现大量的信号蛋白。

很多与整联蛋白聚合体相关的信号蛋白，如图 15.40 所示，也发现存在于生长因子受体周围的信号复合体中。的确，很多整联蛋白信号通路都与生长因子受体通路广范重合，很多生长因子受体也补充到整联蛋白聚合体中，因此很难辨别两类受体的作用。比如，局部粘连激酶（FAK）存在于整联蛋白聚合体中，是几个信号通路的组织者，在控制细胞生长和迁移方面有主要作用。重叠信号通路的结果是，结合细胞外基质分子的整联蛋白也帮助控制细胞生长、抑制程序性细胞死亡。

15.15 整联蛋白和细胞外基质在发育过程中扮演重要角色

关键概念

- 同源重组基因敲除已经应用到 40 多种不同的细胞外基质蛋白和 21 种整联蛋白的小鼠基因上。一些遗传敲除是致命的，另一些有相对温和的表型。
- $β_1$ 整联蛋白基因的定向阻断显示它在皮肤组建和红细胞发育过程中有关键作用。

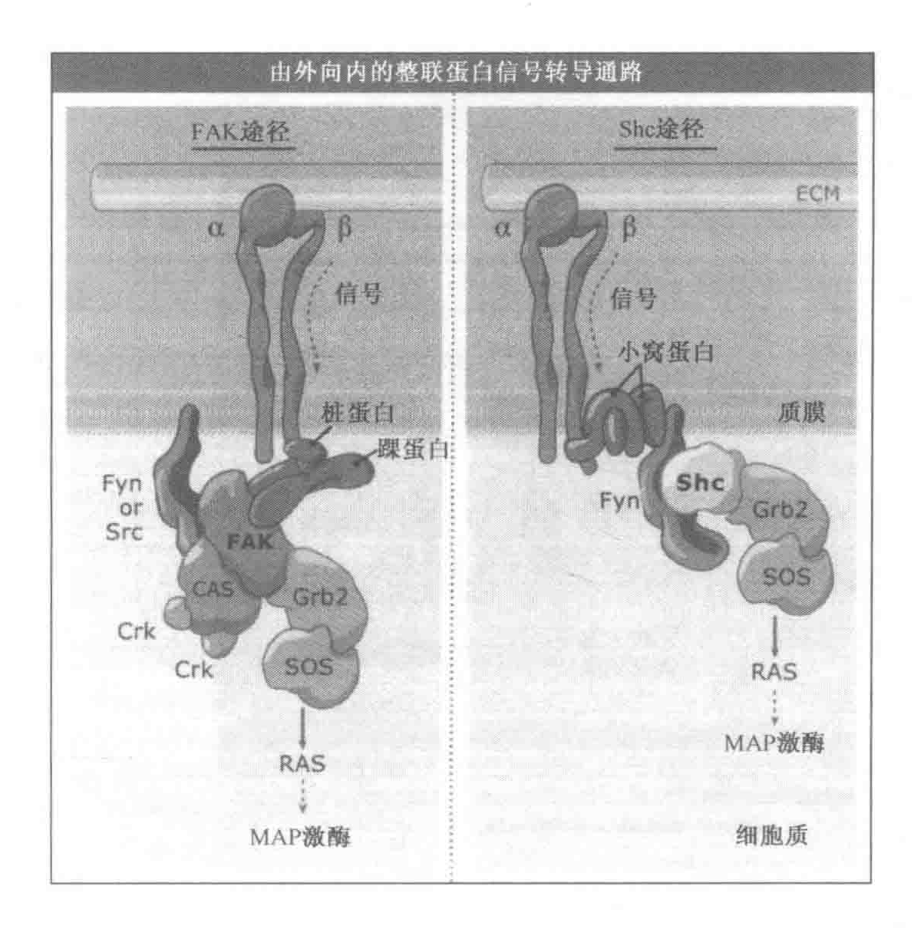


图 15.40　整联蛋白受体的胞质尾端和许多信号及接合体蛋白相互作用。图示是两种信号复合体的模型。一条通路中，原始信号蛋白是 FAK，能直接结合整联蛋白或通过踝蛋白和桩蛋白结合。在另一条通路中，初始信号蛋白是 Shc，通过一个接头蛋白小窝蛋白和整联蛋白相互作用。两个信号复合体都控制 MAP 激酶通路。

对细胞粘连蛋白和它们胞外配基的认知大多来自体外培养细胞和分离蛋白的实验，而实验条件与生物正常的生理状态明显不同。这一还原方法通常可揭示在更复杂更真实的系统中观察不到的蛋白功能。但最终目的还是确定这些蛋白在正常、完整的生物体中有什么作用。

在细胞外基质和细胞连接对完整机体的作用研究中主要应用了两种方法。一种方法是研究模式生物（如果蝇和线虫），因为其发育模式清楚，遗传上易于处理。将这些生物暴露于诱变剂下使之产生随机突变。从突变表型的生物（即发育非正常的生物）中识别突变的基因。

第二种方法更为直接，是选择性地敲除或突变感兴趣的基因，再从发育的过程中研究突变的生物。敲除一个基因最常见的方法是在胚胎干细胞中利用同源重组（见MBIO：15-0002和EXP：15-0001）。这一方法已经应用于小鼠 27 个已知整联蛋白基因中的 21 个。一些整联蛋白突变子及其导致的表型见图 15.41。与此类似，40 多种不同的细胞外基质蛋白，包括糖蛋白、蛋白多糖中心蛋白都在小鼠中被敲除过，见图 15.42。

这些研究已经获知的是细胞粘连和细胞外基质蛋白在发育过程中所扮演的广泛角色。一些遗传上的敲除（如 β_1 整联蛋白、层粘连蛋白 γ_1 链、基底膜蛋白多糖）是

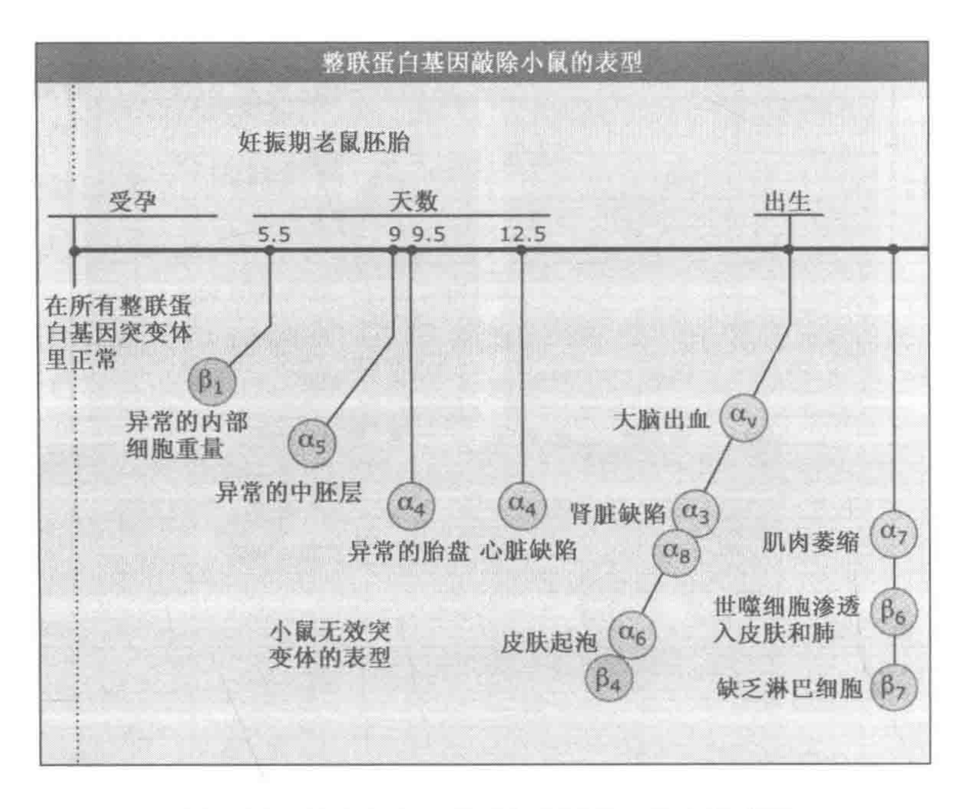


图 15.41 带有突变整联蛋白基因的一些小鼠表型。

致死的，而另一些（如 α_1 整联蛋白、Ⅹ型胶原蛋白、核心蛋白多糖）则导致相对温和的表型。在无症状或温和表型的情况下可能是有功能的冗余，其他整联蛋白能补偿缺失。

由于传统的基因敲除的研究对象是从胚胎发育而来的所有细胞中的目的基因，致死突变就限制了给定蛋白在成体中功能的研究。例如层粘连蛋白 γ_1 缺失的小鼠在受精后5天即不再发育。对这一问题的解决方法是允许正常拷贝的基因在目标组织外的其他所有组织中能正常表达。这些定向敲除是利用Cre/lox系统介导的遗传重组实现的，而不是传统敲除中的自发重组（见MBIO：15-0003和GNIC：15-0002）。

这一方法已经用于研究 β_1 整联蛋白受体在皮肤中的功能。角质化细胞中缺失 β_1 整联蛋白的小鼠能发育到成体，但有很多问题，包括严重的毛发缺失、毛囊损坏、基底膜组装异常、半桥粒组装减少及严重的皮肤起泡。这一表型反映了整联蛋白和细胞外基质蛋白的功能。缺乏 β_1 整联蛋白的皮肤细胞不能形成多种整联蛋白受体（见图 15.33），进而阻止了细胞对基底膜和胞外基质其他成分的吸附。不能粘连到胞外基质的细胞通常会死亡，这就解释了这些小鼠出现的许多问题。例如，形成毛发的上皮细胞死亡就会导致毛发缺失（整联蛋白在细胞生长信号中的详细作用见 15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导）。这些小鼠的研究表明，β_1 整联蛋白基因的一个关键功能就是组建完整组织和其中的胞外基质蛋白（包括不与 β_1 整联蛋白结合的蛋白）。目前的体外研究系统还只能得到这样宽泛的结论。

现在的诱导敲除系统已经进了一大步，健康成年机体的基因也能失活。这一方法已经被用于去除胚胎小鼠和成年小鼠红细胞前体的 β_1 整联蛋白基因，发现这些细胞对骨髓的迁移和吸附被抑制了。实验说明 β_1 整联蛋白是红细胞前体定向转移所必需的。因此，不同类型的 β_1 整联蛋白缺失突变显示了 β_1 整联蛋白在发育的不同时期特定组织中的功能。

细胞外基质蛋白敲除小鼠		
ECM 蛋白	小鼠无效突变体的表型	
短缩素	• 神经缺陷	可育的
胶原 1a1	• 血管缺失	
胶原 2a1	• 软骨异常；椎间盘缺陷	
胶原 3a1	• 血管和皮肤缺失	致死的
胶原 4a3	• 肾脏衰竭	
胶原 5a2	• 皮肤脆弱；骨骼异常	
胶原 6a1	• 轻度肌肉萎缩	可育的
胶原 7a1	• 皮肤起泡	致死的
胶原 9a1	• 软骨缺陷	
胶原 10a1	• 轻度骨骼显型	可育的
胶原 11a2	• 听力缺失	
核心蛋白多糖	• 皮肤脆弱；异常的胶原原纤维	可育的
弹性蛋白	• 血管缺陷	致死的
纤维蛋白原	• 止血功能缺失；怀孕老鼠子宫出血	可育的
纤连蛋白	• 中胚层和心脏血管缺陷；缺少体节	致死的
	• 肌肉萎缩	
层粘连蛋白 $\alpha2$	• 皮肤气泡	
层粘连蛋白 $\alpha3$	• 头骨异常；趾骨融合；缺少胎盘、肾脏发育；	
层粘连蛋白 $\alpha5$	• 致死的	致死的
层粘连蛋白 $\beta2$	• 神经肌肉，肾脏和神经系统缺陷	
层粘连蛋白 $\gamma2$	• 无基膜形成，缺少内胚层分化	
连接蛋白	• 软骨异常	致死的
基底膜蛋白多糖	• 心脏和脑缺陷；软骨异常	致死的
玻璃粘连蛋白	• 无明显的表型	可育的

图 15.42 小鼠细胞外基质蛋白敲除的样本表型。改编自 *Exp. Cell Res.*，vol. 261，E. Gustafsson and R. Fässler，Insight into Extracellular… pp. 52-68。

15.16 紧密连接形成了细胞间的选择性渗透屏障

关键概念

- 紧密连接是在相邻上皮细胞或内皮细胞间连接复合体的一部分。
- 紧密连接在上皮细胞之间调控颗粒物质的运输。
- 紧密连接还维持着上皮细胞的极性，像围栏一样防止质膜蛋白在顶部或底部区域扩散。

胞间连接在多细胞性的建立和维持方面有重要的作用。沿着上皮细胞层和内皮细胞

层的相邻细胞的侧面，有三种分开的负责细胞间连接的**连接复合体**。脊椎动物中，这些连接是**紧密连接**、**粘连连接**和**桥粒**；在无脊椎动物中，分隔连接通常起着紧密连接的作用（见 15.17 无脊椎动物的分隔连接类似于紧密连接）。这些连接的相对位置如图 15.43 所示。这些连接组合在一起将多细胞生物分隔成分散的特化区域，并调控它们之间的分子运输。这些连接也能保护细胞不受物理化学伤害。我们将依次讨论复合体中的每种连接，首先是紧密连接（粘连连接见 15.18 粘连连接将相邻细胞连接在一起；桥粒见 15.19 桥粒是基于中间纤维的细胞粘连复合体）。

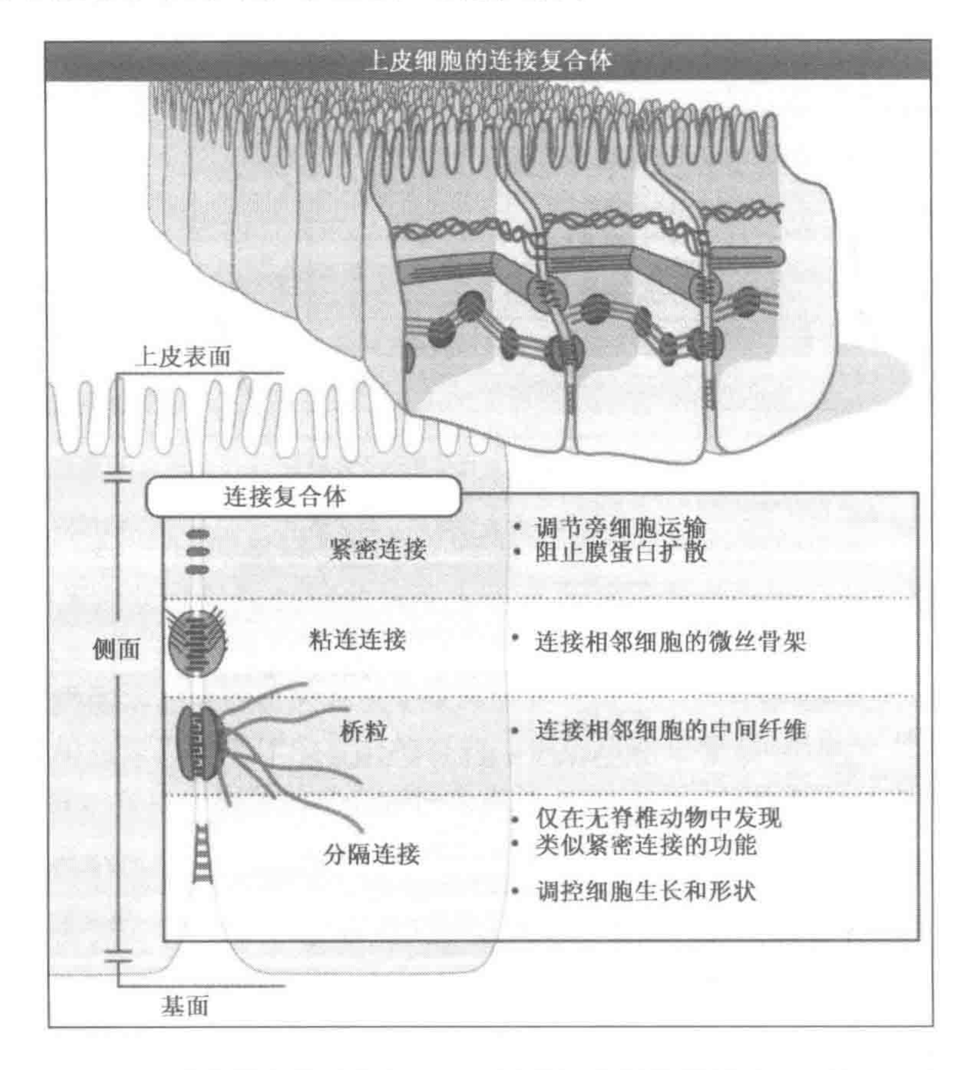


图 15.43　连接复合体至少由三种不同的细胞间连接组成。它使得上皮细胞具有结构支持的功能，并能作为运输的选择性屏障。分隔连接只存在于无脊椎动物中，通常用来代替紧密连接。

用透射电子显微镜观察细胞的超薄切片，紧密连接看起来就像相邻细胞相对侧膜之间的一串小接触点（有时候叫做“吻”），如图 15.44 所示。这些接触点附近的膜内面蛋白看起来是浓密的电子“云”。而细胞的凝结面显示蛋白分布于两层脂分子中，质膜在中央隔开。紧密连接看起来是网状的原纤维薄层，蛋白埋于膜内或在切片过程中流失形成沟状。

紧密连接的分子组成是很复杂的，已经识别出至少 24 种蛋白。至今在紧密连接中发现了三类跨膜蛋白：claudin、occludin 和结合粘连分子（JAM），如图 15.45 所示。

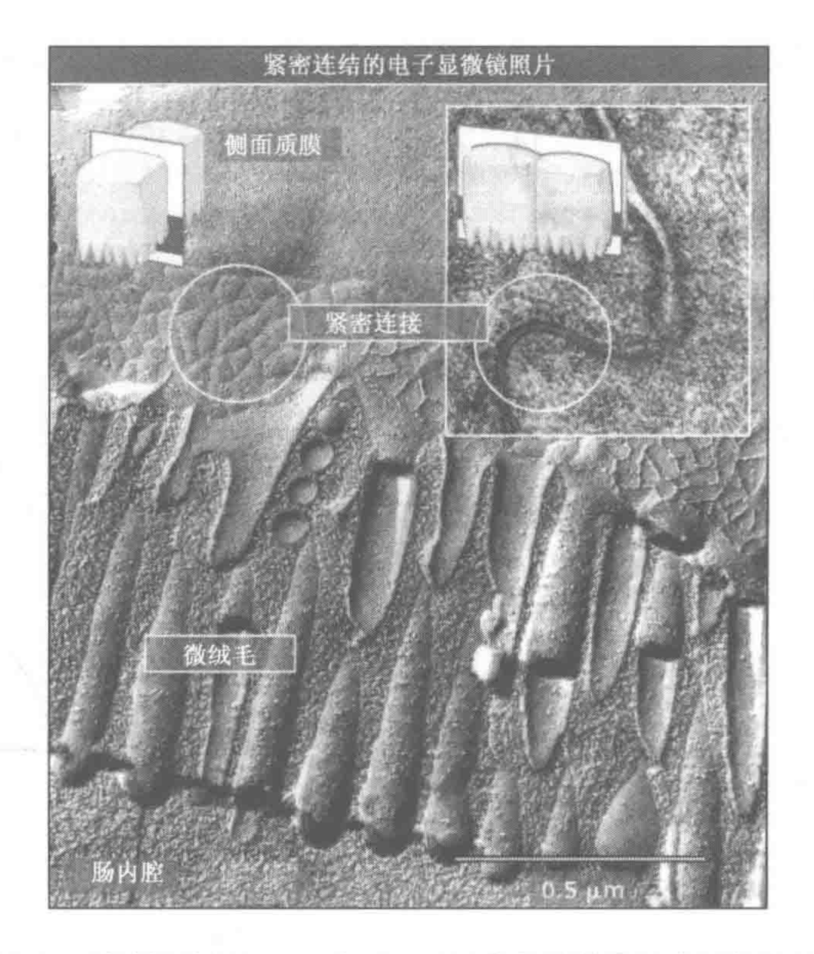


图 15.44　冰冻切片的电子显微图显示网状的原纤维组成了紧密连接。透射电子显微图显示紧密连接中有膜接触。示意图显示了图像的不同平面。照片复制自 *Cell Communications*，Dr. Rody P. Cox，Copyright© 1974。获得 John Wiley & Sons Inc. 许可。

Claudin 是紧密连接原纤维的核心蛋白。它们将胞外结构域聚集成环，形成原纤维的选择性孔道作为核心。哺乳动物中至少有 24 种不同的 claudin，它们排列成不同的组合，形成不同的离子选择性通道。将 Claudin 基因转染进入正常情况下不表达的细胞中会导致紧密连接的形成。Occludin 沿着紧密连接原纤维与 claudin 发生侧向共聚合，但它们的功能尚不清楚。

三种跨膜蛋白与 9 个或更多个结构蛋白稳定结合，包括肌动蛋白。它们也能和十几个信号蛋白短暂结合。这说明紧密连接还具有其他的作用，比如作为细胞表面信号的组织者，类似于局部粘连复合体在细胞底面的作用（局部粘连的细节见 15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导）。

很多其他的局部连接蛋白，如 ZO-1，含有特异序列，属于与膜相关的鸟苷酸激酶家族蛋白（MAGUK），包含特定顺序的三个结构域。这些结构域使得 MAGUK 能结合很多类型的靶蛋白，包括信号蛋白和肌动蛋白细胞骨架的成分。一些紧密连接蛋白也包括 PDZ 结构域，使之能彼此结合。这些蛋白的完整或缺失形式的体外结合实验说明，紧密连接上有大量可能的结合组合方式。

紧密连接有两个重要的功能。首先，它们是上皮或内皮细胞层中调控细胞旁路运输（细胞间空间的物质传输）的分子结构（历史上，它们曾被认为是阻断这一运输的障碍，

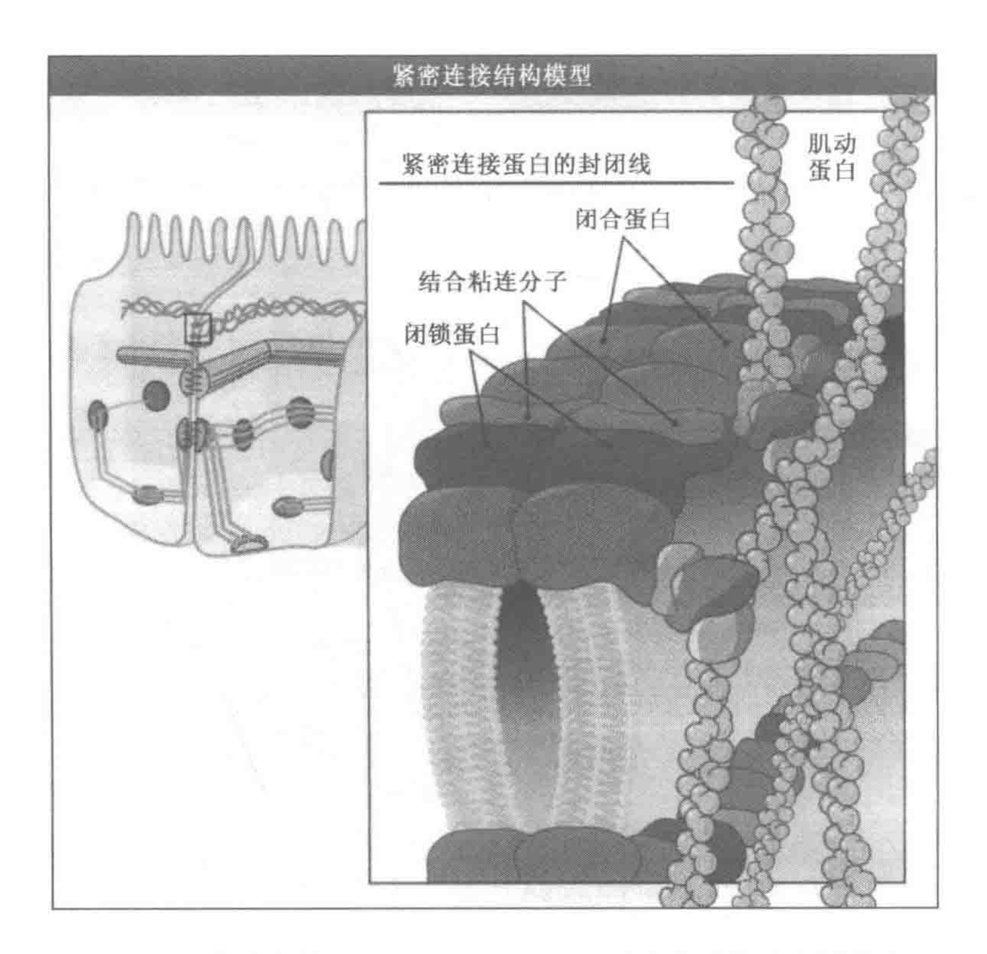


图 15.45　紧密连接由 claudin、occludin 和结合粘连分子共同形成。

因而得名闭合小带)。在这一功能中，紧密连接可以看作是一个“分子滤网”，通过它，胞外分子在穿过内皮细胞和上皮细胞界面时得到滤过。不是所有的滤网都一样，每种组织负责滤过一类扩散分子：例如烟尘要在肾脏被滤过。事实上，穿过紧密连接的自由扩散颗粒限制是 4～40Å，具体取决于其所在的组织。

离子和其他溶质运输的物理障碍是迥然不同的：离子是瞬时运输，其他分子要几分钟甚至几小时才能穿过紧密连接。这是为什么？最新的一个模型提出，紧密连接渗透屏障由几排电荷选择性孔道形成，如图 15.44 所示的脆性纤维网。离子能穿孔运输，而其他溶质必须等到纤维断裂才能穿过连接。随着纤维的断裂和愈合，溶质逐步地通过屏障，如图 15.46 所示。

紧密连接的第二个功能是从结构和功能上将极性细胞的质膜分为两个区域，如图 15.43 所示。**顶面**是上皮层向着空腔一面的质膜部分，**底面**是相反的区域，接触细胞外基质。侧面是将这两个区域联系在一起的“面”。紧密连接沿着侧面的顶-侧交界完全环绕上皮细胞和内皮细胞，从而将细胞分为两个区域：顶面区域和底外侧区域。这些能将细胞表面有效地分为“顶”“底”区域，并在控制分子传输的跨细胞路线上扮演不同的角色（见第 4 章蛋白质在膜之间的运输）。尽管膜蛋白能在平面的每个区域扩散，它们却不能跨过紧密连接从一个区域扩散到另一个区域。这样，紧密连接就像一个围栏，维持着两个区域独特的分子组成。

扩散障碍的分子机制尚不完全清楚，两个大分子复合体已经鉴定出来，它们在上皮细胞和内皮细胞质膜蛋白极性分布的建立和维持上明显扮演重要的角色。改变这些蛋白

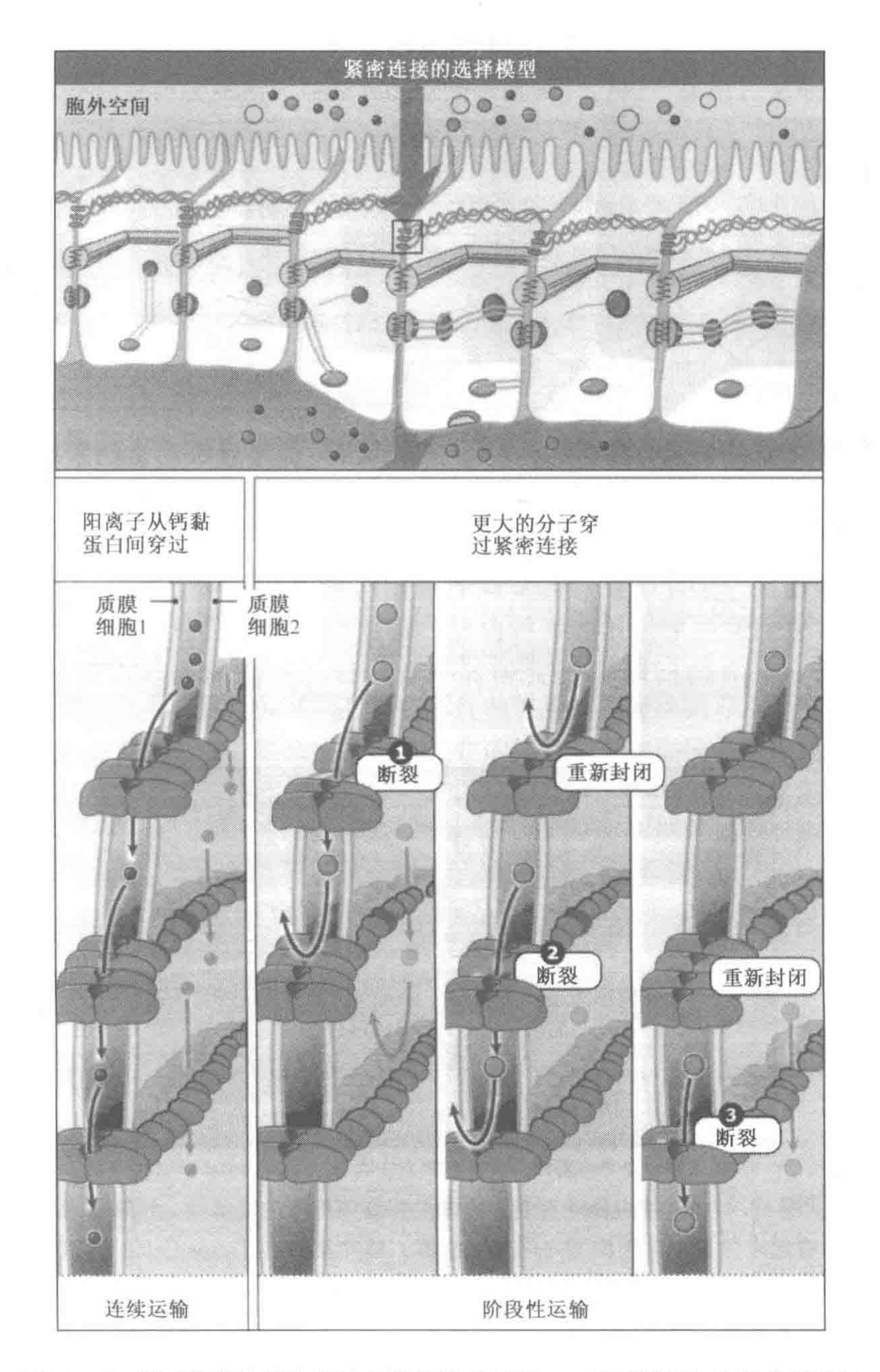


图 15.46 紧密连接溶质的快速和慢速运输模型。一些离子的快速运输是通过位于连接纤维中的离子通道。慢速运输时溶质不能穿过通道，只在纤维断裂时才能流过缝隙。由于存在多层纤维，这种运输形式呈现阶段性。

的表达会导致细胞极性的明显缺失。这些复合体存在于紧密连接之中，能直接和上面提到的网状纤维蛋白结合。

15.17 无脊椎动物的分隔连接类似于紧密连接

关键概念

- 分隔连接只存在于无脊椎动物，类似于脊椎动物的紧密连接。
- 分隔连接是相邻上皮细胞质膜间一组平直或折叠的壁。
- 分隔连接主要的功能是作为细胞旁扩散的屏障。
- 分隔连接具有两种与紧密连接无关的功能：它们控制发育过程中的细胞生长和细胞形态。分隔连接有一套特殊的蛋白参与完成这些功能。

分隔连接只存在于无脊椎动物，功能上被认为类似于脊椎动物的紧密连结（紧密连接的细节见 15.16 紧密连接形成了细胞间的选择性渗透屏障）。然而一些无脊椎动物同时包含紧密连接和分隔连接。分隔连接是上皮细胞侧面上的膜连接复合体的一部分，像紧密连接一样，在控制上皮细胞层胞间的旁向运输上有重要作用。电子显微镜下观察，它们看起来是几套平行的壁，跨越相邻细胞质膜间 15～20nm 宽的沟。如图 15.47 所示，有的间隔看上去相对平直叫做光滑分隔连接，也有的折叠成褶皱状。

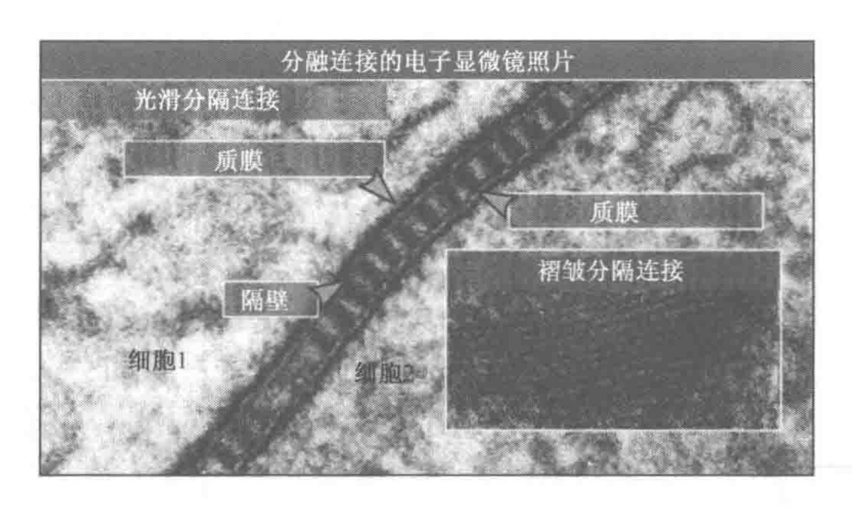


图 15.47　光滑分隔连接看上去像是相邻细胞间的线状壁。褶皱分隔连接看起来像是相邻细胞膜之间的折叠墙。照片复制自 *Tissue Cell*, vol. 13, Green, C. R., A Clarification of Two Types... pp. 173-188. Copyright 1981，获得 Elsevier 许可。

分隔连接和紧密连接至少在三方面不同。首先，紧密连接不含有分隔连接中的组分蛋白。第二，分隔连接在侧面膜上更接近于底边缘，而紧密连接接近于顶边缘，位于带状粘连之“上”（见图 15.43）。第三，分隔连接还扮演两个与紧密连接无关的角色。

一些细胞在同一连接复合体中既包括分隔连接又包括紧密连接，说明它们有不同的功能。当细胞同时包含紧密连接和褶皱分隔连接时，紧密连接是作为细胞旁向运输的主要屏障。这一观察来自于电子显微镜研究：通过电子密度示踪染料观察相邻细胞间通过的分子大小。分隔连接也可能作为肌动蛋白纤维的结合位点，类似于紧密连接。那么，分隔连接的功能是什么？

像紧密连接一样，分隔连接也对连接复合体的“门控”和“围栏”作用作出贡献。它们限制细胞外颗粒物质在相邻细胞间的流动，起到“门控”作用；又限制磷脂和膜蛋白在膜的顶端区域和底部区域间流动而起到“围栏”作用。

但是，与紧密连接不同的是，分隔连接还具有两项其他的功能。一项是帮助控制细胞生长。例如，表达突变分隔连接蛋白的果蝇或线虫常常发育成上皮细胞瘤。另一项是控制细胞形态：另一套分隔连接蛋白的突变导致了果蝇细管的异常加粗。分隔连接如何实现这些功能？为了解决这一问题我们需要讨论分隔连接的蛋白组成。如图 15.48 所示，果蝇中几种分隔连接蛋白已经得到鉴定。

Scribble 基因编码 Scrib，这是最重要的分隔连接蛋白之一。不像正常果蝇的胚胎发育出光滑的外层（角质层），突变 Scribble 的纯合子胚胎在角质层上形成崎岖不平的线状纹路，就像有人乱画过一样，如图 15.49 所示。这些畸变的出现是由于角质层中没有形成分隔连接。形成角质层的上皮细胞没有正常地排列，它们堆积起来形成沟壑。在 Scrib 突变中，其他的上皮组织相比于正常胚胎也显得更大与无序。

除了在分隔蛋白上的功能，Scrib 蛋白还至少与两个其他的连接复合体蛋白：大圆盘（Dlg）和致命巨大幼虫（lgl）蛋白相互作用，起始细胞极性的形成。当这些蛋白突变时，上皮细胞就会缺失分隔连接。并且，它们在意外的位置（侧膜的底部）形成紧密连接，顶部膜蛋白也没有适当的归类。结果细胞没有正常的极性，上皮层的完整性缺失了。有趣的是，这些突变细胞通常比正常细胞分裂更频繁，这使得上皮细胞发生异常的大量聚集。

另一部分分隔连接基因编码至少 8 种不同的蛋白，包括精液素，它能在果蝇气管系统上皮内管形成时控制细胞形态。这些基因的突变导致上皮细胞顶面的扩大，内管直径也明显扩大。奇怪的是，这些细胞的生长不受影响。这些突变的分隔连接保留了与紧密连接相关的屏障功能，说明这些功能是独立的。两个通行的模型指出，分隔连接通过控

果蝇的分隔连接蛋白	
分隔连接蛋白	功能
Coracle	• 细胞延展和发育时的背向闭合
Discs large 1	• 在上皮细胞和神经细胞里形成分隔连接
Discs lost	• 细胞胚盘形成时胚胎上皮细胞的极化
Expanded	• 通过抑制细胞增殖调节成虫盘的生长
Fascilin 3	• 同种的细胞粘连分子
Lethal（2）giant larvae	• 形成细胞骨架网络结构 • 肿瘤抑制物
Neurexin	• 形成褶皱分隔连接 • 细胞形状的调节
Polychaetoid	• 发育时的背向闭合
Scribble	• 控制上皮细胞的生长和极性
α-spectrin	• 分隔连接形成所需的膜骨架蛋白

图 15.48　果蝇体内分隔连接蛋白的功能。

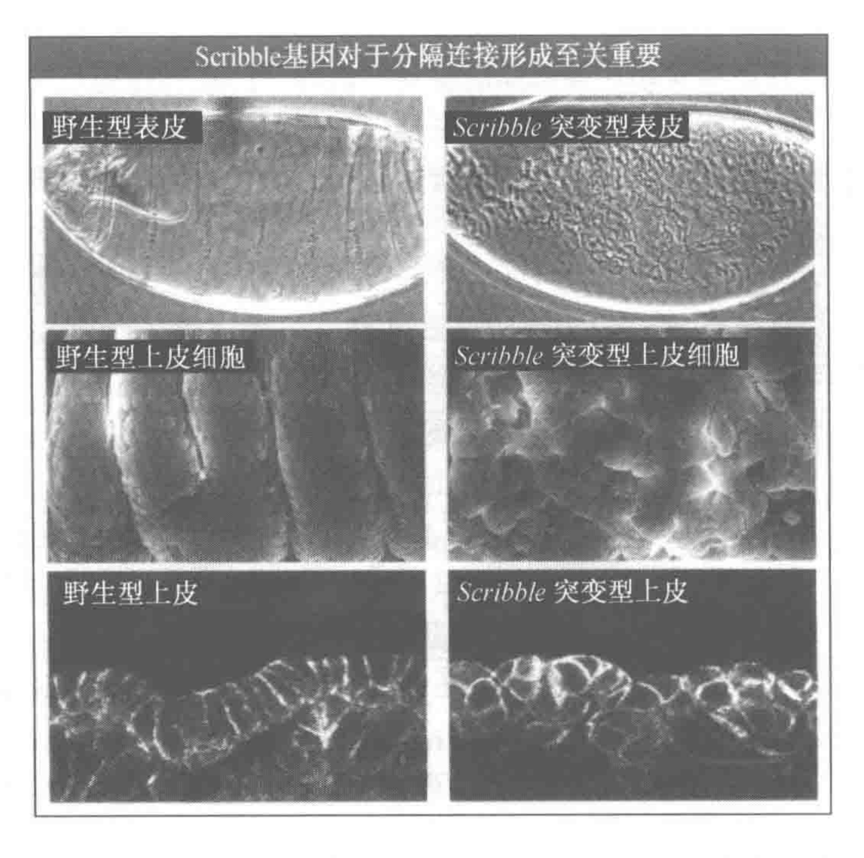


图 15.49　正常（野生型 WT）果蝇胚胎（左）和 Scribble 突变胚胎（右）的对比。顶部：胚胎状态对比图。中部：14 天胚胎的扫描电子显微图。底部：15 天胚胎血影蛋白分布的免疫荧光图。血影蛋白是上皮细胞的标记。照片复制自 Bilder，D.，and Perrimon，*N. Nature*. 2000. 403：611-612。照片由 Harvard 医学院的 David Bilder 惠赠。

制膜顶部区域蛋白的行为或通过控制细胞顶面胞外基质的形成而控制细胞形状。

分隔连接形成与细胞分裂及形态控制的精确关系尚不清楚。然而答案可能清楚地显示在很多组织中上皮细胞的生长机制上，包括一些疾病如人类癌症和肾病（这一案例显示了果蝇研究对人类健康的贡献）。

Scrib 的另一个有趣的特征是它属于含 **PDZ 结构域**的蛋白家族。这种结构域存在于很多细胞间的连接蛋白上，被认为能够介导跨膜蛋白和胞质蛋白的结合，类似于信号蛋白上发现的其他结构域。人们正努力探究分隔连接蛋白，如 Scrib，在上皮细胞功能中如此多变而重要的角色下潜藏的分子机制。

15.18　粘连连接将相邻细胞连接在一起

关键概念

- 粘连连接是一个连接相邻细胞的与细胞表面结构域相关联的家族。
- 粘连连接包含跨膜的钙黏蛋白受体。
- 最清楚的粘连连接，带状粘连，位于粘连复合体内，在一些组织的相邻上皮细胞间形成。
- 带状粘连里，接头蛋白叫连环蛋白，连接钙黏蛋白与肌动蛋白丝。

粘连连接是连接复合体的成分，使上皮细胞和内皮细胞彼此结合。电子显微镜下，

粘连连接看起来是相邻细胞质膜附近暗淡的厚带，由伸入胞内空间的杆状结构连接。最清楚的粘连连接是**带状粘连**，如图 15.50 所示。它存在于一些上皮细胞间的连接复合体中，位于紧密连接之下（见图 15.43）（发现它的显微镜学家将其命名为带状桥粒，因为它看起来像一个大型桥粒。我们现在知道它和桥粒连接非常不同，这个名字就不再使用了）。如图 15.51 所示，粘连连接还有一些其他例子，包括中枢神经系统神经元间的突触、相邻心肌细胞之间的闰盘以及外周神经髓鞘层之间的黏性连接。

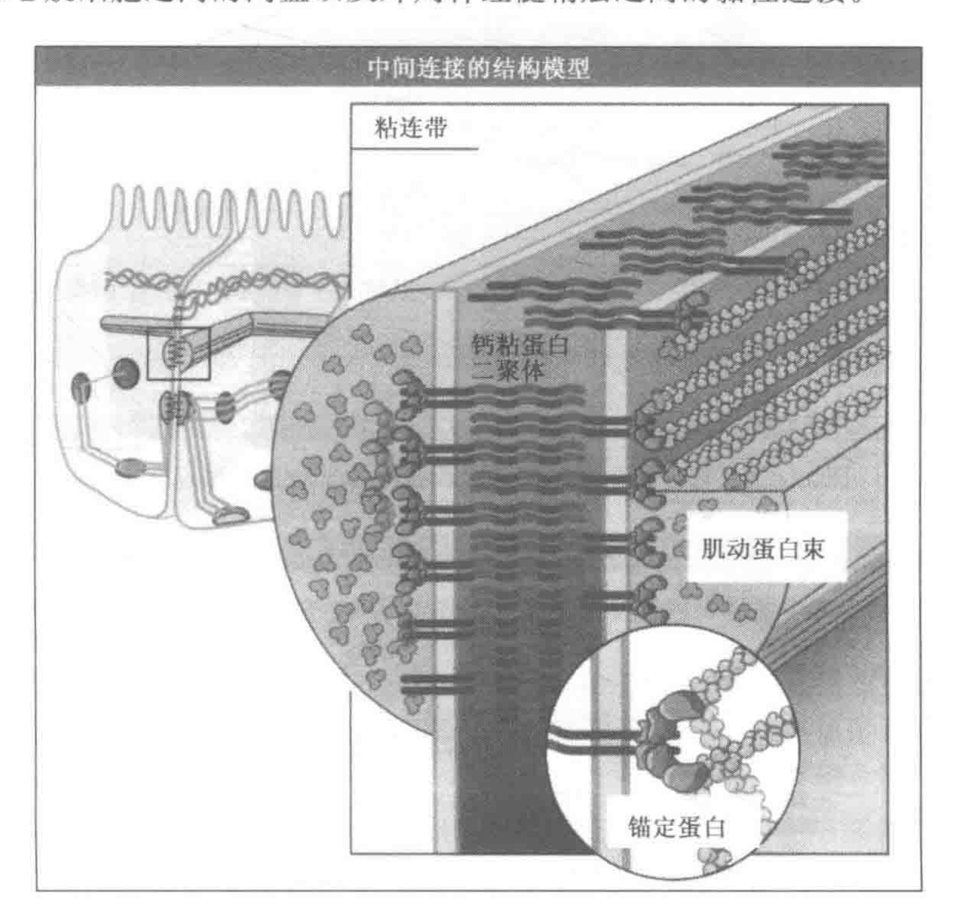


图 15.50　中间连接是连接复合体的一部分。肌动蛋白束在质膜的胞质面与连接附着。钙黏蛋白在细胞间形成杆状，通过靶定蛋白如连环蛋白，连接到肌动蛋白细胞骨架上。

如果不考虑位置，粘连连接有两个特征。首先，它们包含能结合相邻细胞上同类的钙黏蛋白的跨膜受体蛋白，如图 15.50 所示（钙黏蛋白的细节见 15.22 钙依赖的钙黏蛋白介导细胞间的粘连）。一个细胞上的受体结合于另一个细胞上的同型受体叫做**嗜同种结合**。人们认为这能帮助细胞找到特异性的结合对象，因而在组织的细胞排列决定上有重要作用。钙黏蛋白的这一点可以如此证明：在同一类型细胞的两个群体中表达两种不同的钙黏蛋白受体，再将两群细胞混合于同一培养皿中，如图 15.52 所示。几小时后，表达同种钙黏蛋白受体的细胞自成一群。如果向培养基中加入抗体，阻断钙黏蛋白的嗜同种结合位点，这种群体就不会形成。

粘连连接中的钙黏蛋白二聚受体包含 5 个胞外结构域，它们准确地控制嗜同种结合的发生。如图 15.53 所示，这些结构域有三种可能的重叠排列方式。最强的结合是受体以反向平行排列完全重叠，当受体局部重叠时，相互结合作用就要弱一些。通过改变钙黏蛋白受体在表面的聚集数量，细胞就能改变对相邻细胞的结合力（这一过程叫做亲

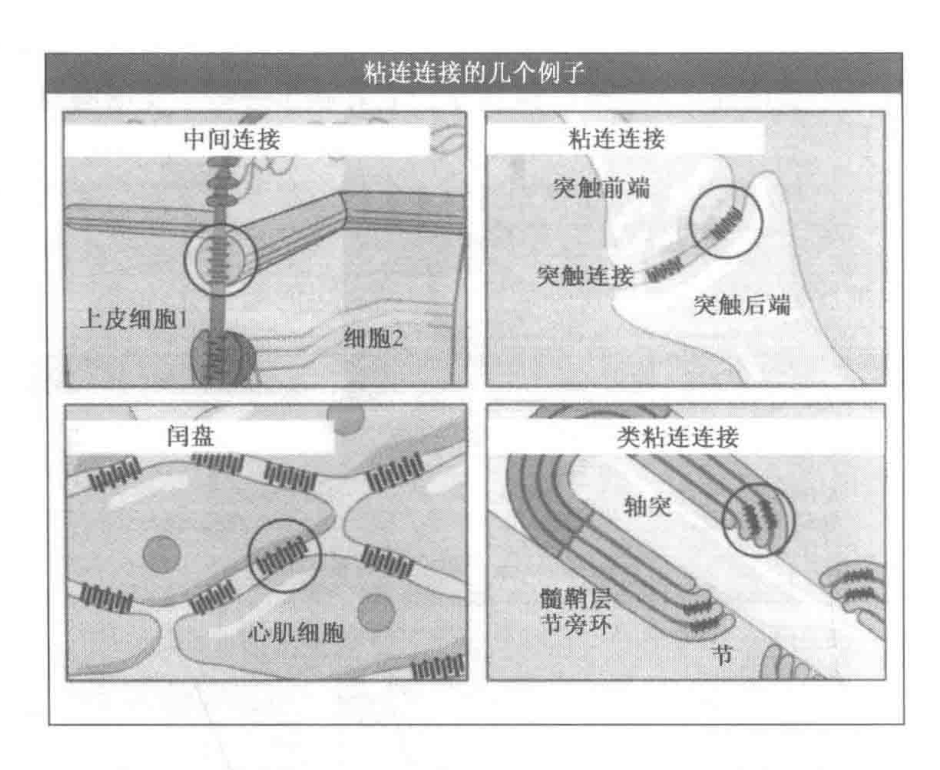


图 15.51　每种粘连连接都是将相邻细胞紧密地连接在一起。

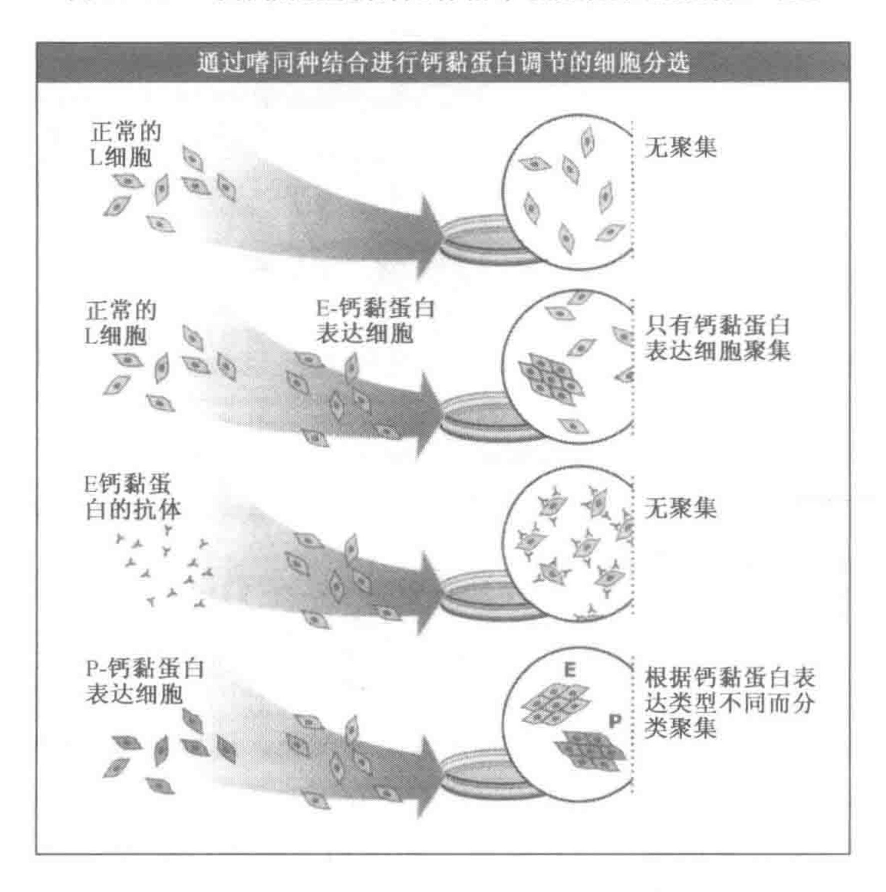


图 15.52　表达同种钙黏蛋白受体的细胞会彼此识别及选择性结合。这种嗜同种（homophilic）结合方式在发育过程中的组织构建上扮演重要角色。

合性调整）。没有证据表明钙黏蛋白能发生构象变化（如同整联蛋白受体中用到的亲和力调整）来改变亲和力从而控制粘连连接的结合力（亲和性和亲合力调整的细节见15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导）。

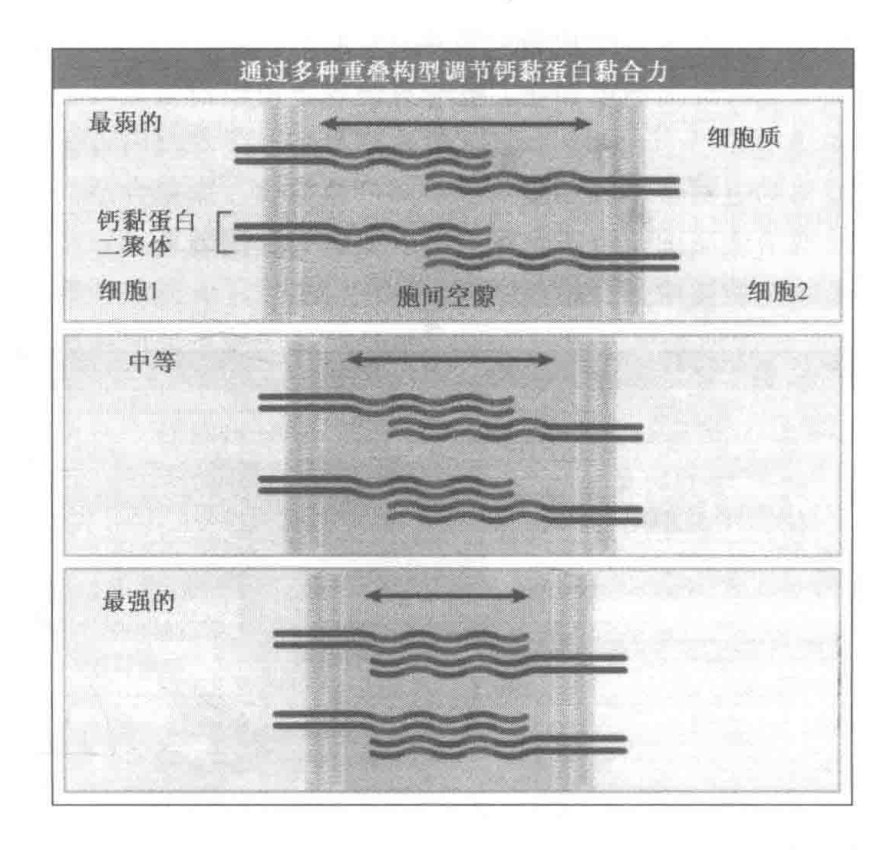


图 15.53　钙黏蛋白形成二聚体彼此结合，图中显示了钙黏蛋白相互作用的三种不同构型。黏合力的直接测量表明具有最大重叠的构型是最强的。

粘连连接具有的第二个特性是它们形成强有力的连接，使组织能改变形状或抵抗垂直压力。例如，带状粘连通过锚蛋白，即连环蛋白，将钙黏蛋白受体的胞质尾端连接到肌动蛋白束的钙黏蛋白受体上，如图 15.50 所示。这些肌动蛋白纤维依次与肌球蛋白附着，使肌动蛋白纤维能彼此滑动。这将引起收缩并改变上皮细胞顶部的形状。举例来说，这对神经管的发育是很重要的，这时上皮细胞内陷才能封闭神经沟（见 15.22 钙依赖的钙黏蛋白介导细胞间的粘连）。

除了基于钙黏蛋白的粘连，粘连连接的特异性功能尚需确定。果蝇遗传学研究表明，除了钙黏蛋白和连环蛋白，还需要其他的蛋白质以形成形态学上特殊的带状粘连。这些蛋白质可能参与调控远离粘连连接的细胞骨架组装。比如说，它们可能参与上皮细胞极性的建立，因此可能间接影响其他细胞连接的组装，包括紧密连接。具体情况如何尚处于研究之中。

15.19　桥粒是基于中间纤维的细胞粘连复合体

关键概念

- 桥粒的主要功能是通过连接各细胞的中间纤维网，维持上皮细胞层的结构完整性。
- 桥粒是连接复合体的成分。
- 桥粒中至少有 7 种蛋白。桥粒的分子组成随细胞和组织类型的不同而不同。
- 桥粒既能作为粘连结构，又能作为信号转导复合体。
- 桥粒成分的突变会导致上皮结构的脆性。这些突变可能是致命的，尤其当它们影响皮肤的组织时。

桥粒是上皮细胞连接复合体的成分（见图 15.43），也在一些非上皮细胞中，如心肌、肝脏、脾以及一些神经细胞中存在。电子显微镜下可以清楚地看到桥粒的三个明显特征，如图 15.54 所示：

大量原纤维积累穿过两个相邻细胞的质膜间的缝隙。

这些纤维在质膜的胞质面与电子密度很高的致密斑相附着。

致密斑与每个细胞胞质中的纤维相结合。

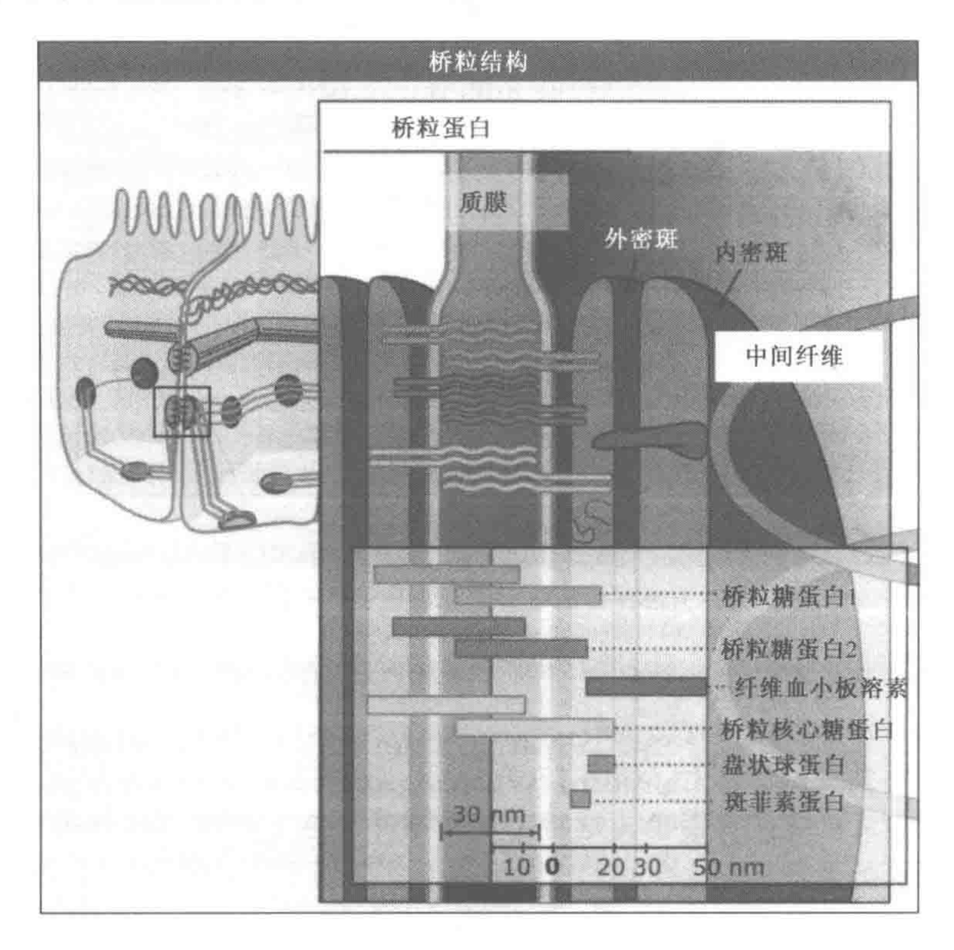


图 15.54　桥粒蛋白分布于质膜上，是细胞表面独特的双斑排列。

致密物质在质膜处的积累包含着两种不同的结构：内致密斑和外致密斑。每个桥粒都很小，平均直径约 0.2μm，其中几个能在相邻细胞的边缘处看到。这个结构更像一座浮桥：相邻细胞的胞质纤维通过胞外的桥连纤维接到质膜起支撑作用的“锚”上。因此，这一结构得名桥粒，来自于希腊语“链”和“体”。这一结构的意义显然是将两个细胞连接在一起。

这一连接在细胞中有什么功能？联想图 15.43 所示的连接复合体的两个主要功能：控制细胞侧向运输和抵抗施加在上皮组织中的物理应力。在暴露于物理应力下的细胞中，如皮肤和心肌，桥粒都特别丰富，细胞生物学家认为它们对后一功能有一定贡献。因此，连接到致密斑上的胞质纤维叫做张力丝，推测它们处在张力之下。之后确认了这些纤维是中间纤维，一种主要的细胞骨架结构，尽管它们有时仍被叫做张力丝（中间纤维的细节见第 9 章中间纤维）。

除了中间纤维，至少 7 种不同的蛋白质存在于桥粒，它们可以分为三个家族。其中三个蛋白（桥粒核心糖蛋白、桥粒糖蛋白 1、桥粒糖蛋白 2）是细胞表面受体钙黏蛋白

超家族的成员（见 15.22 钙依赖的钙黏蛋白介导细胞间的粘连）。这些蛋白是桥粒中主要的跨膜蛋白，是外致密斑的主要成分，如图 15.54 所示。它们形成“桥连纤维”在胞间伸展，作为胞质蛋白犰狳类（盘状球蛋白、plakophilin）和血小板溶素（纤维血小板溶素）家族成员的结合位点。纤维血小板溶素结合内致密斑的中间纤维蛋白。桥粒的精确组成及桥粒的形成数量随细胞类型的不同而变化，反映了细胞承受应力的变化。

关于桥粒的普遍描述是它作为相邻细胞的“斑点焊接”。除了这一结构上的作用，桥粒蛋白还在细胞表面有重要的信号功能。例如，盘状球蛋白与 β 连环蛋白关系密切，能在“经典的”粘连连接中结合钙黏蛋白。β 连环蛋白是粘连连接中的结构蛋白，也能将信号转导入细胞核（粘连连接见 15.18 粘连连接将相邻细胞连接在一起）。盘状球蛋白和 plakophilin 同样也能在细胞表面信号受体的刺激下进入核。盘状球蛋白甚至直接结合生长因子受体。信号活化的结果是桥粒能控制多基因的表达，明显地影响细胞中别处定位的蛋白质功能，包括其他连接。

桥粒功能最引人注目的证据来自桥粒结构受损的情况。在这些情况中，上皮层是很脆弱的，它们覆盖的器官也易受损伤。特别是皮肤出现严重的起疱。用显微镜观察发现，缺乏桥粒的上皮细胞严重紊乱，缺乏连接复合体，分离成一个个小片，而不是形成一个连续的片层。

缺乏桥粒或桥粒受损的病人会有多种病症，根据器官可以大致分为两类。**遗传性皮肤病**，如掌跖角化病、结合型大疱性表皮松解，分别来自于桥粒或半桥粒蛋白的突变（半桥粒见 15.20 半桥粒连接上皮细胞和基底膜）。**自身免疫的大疱性皮肤病**，如寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮，分别起因于病人产生了桥粒或半桥粒蛋白的自身抗体。这两种类型中，细胞连接的结构和功能都被严重破坏，这些疾病可能是致命的。

分子遗传学和组织工程学相结合已经用于检测治疗这些疾病。至少在遗传性皮肤病中，产前筛查可以用于检测桥粒基因的突变。筛查使用 PCR 技术从胎儿组织样本中扩增感兴趣的基因（例如桥粒糖蛋白 1）。DNA 再用限制性片段长度多态性或 Southern 印迹技术进行分析。

对于这些疾病患者的治疗当前主要集中在保护皮肤、避免可能引起发疱的危险行为，其结果是患者生活质量极低。一项正在被评估的实验治疗是组织工程皮肤的应用。通过人工细胞外基质培养的正常活细胞皮肤层取代损坏的皮肤，研究者希望发展出更稳定的、抗创伤并能形成正常桥粒的皮肤。

15.20 半桥粒连接上皮细胞和基底膜

关键概念

- 半桥粒，像桥粒一样为上皮细胞层提供结构稳定性。
- 半桥粒存在于上皮细胞的底面，通过跨膜受体连接胞外基质与中间纤维网。
- 半桥粒的结构和桥粒不同，至少包含 6 种特有蛋白。
- 半桥粒基因突变产生的疾病类似于桥粒基因突变的相关疾病。
- 调控半桥粒组装的信号通路尚不清楚。

半桥粒是上皮细胞质膜底面上的细胞表面连接。如图 15.55 所示，这一结构是“斑

块”和纤维的交织，看起来像半个桥粒（见 15.19 桥粒是基于中间纤维的细胞粘连复合体）。然而除了外表，半桥粒可不是简单的半个桥粒。半桥粒的主要功能是将上皮细胞层锚定在基底膜上。这就进一步区别了半桥粒和桥粒。两种结构都能整合上皮细胞层，它们在细胞中彼此向着相同的角度（见图 15.43），因此能抵抗不同类型的机械压力。两种结构共同由中间纤维连接，形成相当强韧的网络。半桥粒功能的缺失会导致很多上皮组织的严重发疱，包括皮肤，这些疾病可能是致命的。

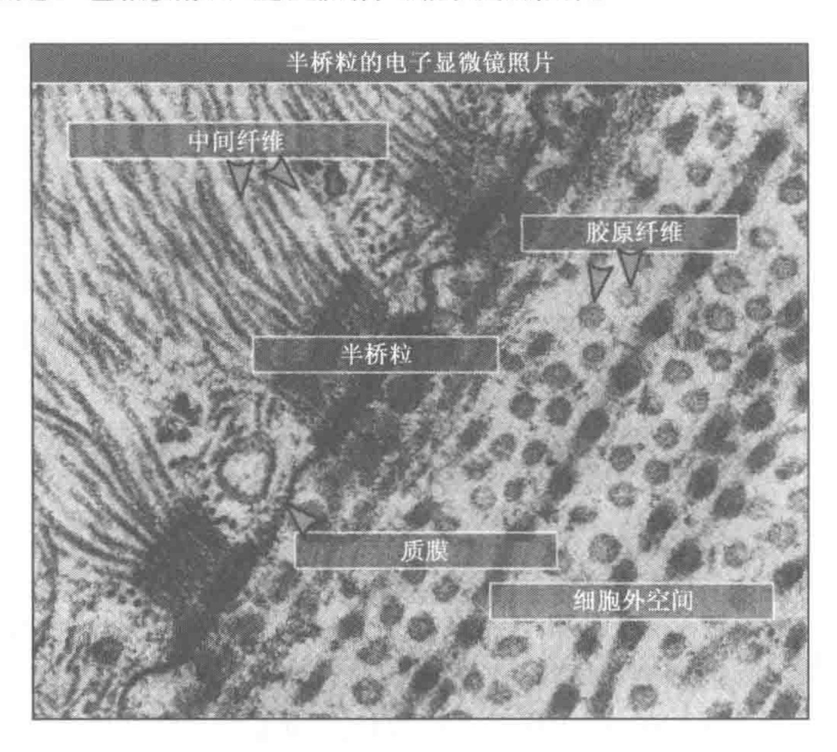


图 15.55　半桥粒是上皮细胞和特化的细胞外基质基底膜之间连接的特化结构。半桥粒的特征是纤维末端聚集在细胞表面的致密斑上。照片由 William Bloom 博士和 Don W. Fawcett 博士惠赠。复制自 *A Textbook in Histology*，1986，复制自 *The Journal of Cell Biology*，1966，vol. 28，pp. 51-72. 获得 Rockefeller 大学出版社版权许可。

图 15.56 显示了半桥粒的组成。在“经典”（Ⅰ型）半桥粒的胞质面，我们看到了一簇中间纤维（角蛋白 5 和 14）连接到内致密斑上（见图 15.55）。这一斑块由蛋白 BP230 和 HD1 组成，能结合中间纤维蛋白。外致密斑包含两种跨膜蛋白，一种整联蛋白受体（$\alpha_6\beta_4$），一种胶原蛋白家族成员（胶原蛋白 X Ⅶ 或 BP180）。在胞外基质中，锚定纤维（由 BP180 和胞外基质蛋白层粘连蛋白-5 组成）由质膜向外突出，通过透明板插入致密斑。致密斑包含多种基底膜蛋白（见 15.11 基底膜是特化的细胞外基质）。最终，Ⅶ型胶原蛋白的锚定纤维将致密斑连接到基底下致密板，基底下致密板是由几种胞外基质蛋白组成的。Ⅱ型半桥粒缺乏 BP180 和 BP230 蛋白，存在于肠等组织中。

尽管半桥粒在维持组织完整性上有极其重要的作用，但它主要是静态的结构。例如，皮肤切口的愈合需要相邻细胞从下面的基底膜分离，迁移到受伤区域。细胞在那里分裂再生，填补受伤区，再重新彼此粘连附着于基底膜。这一表型的改变要求细胞与细胞之间以及细胞与基底膜之间能分别先解离开再重新组合，如桥粒和半桥粒解离与再形成。

基于体外创伤愈合测试中培养的上皮细胞实验提出了半桥粒解离与组装机制的模型。结果发现当细胞迁移时，半桥粒蛋白仍保持复合状态，并被细胞内吞作用摄入。之后，当

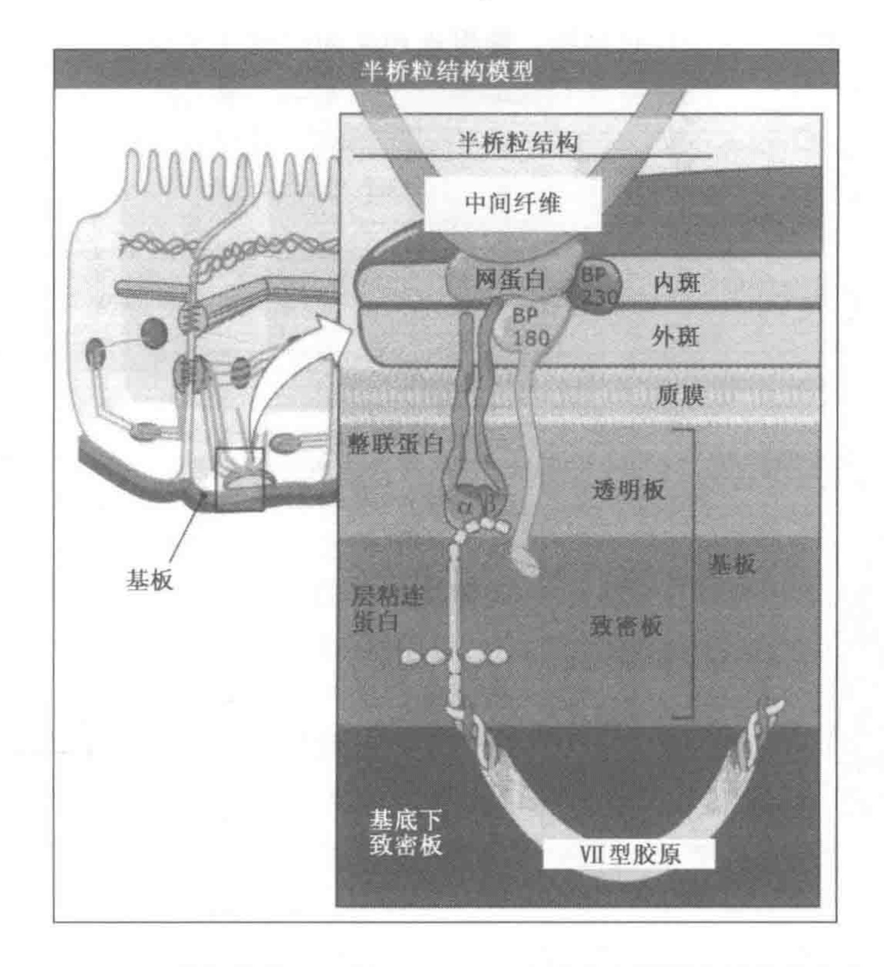


图 15.56 半桥粒连接到基膜，基膜由基底膜和胶原蛋白纤维网组成。

细胞处于静息状态，重新附着基底膜时，这些复合体在细胞表面重新出现形成半桥粒。

$\alpha_6\beta_4$ 整联蛋白受体对半桥粒的重组有关键作用。将阻断 $\alpha_6\beta_4$ 整联蛋白结合其胞外配基（层粘连蛋白-5）的抗体加入细胞中，半桥粒则不能在细胞表面形成。其他实验也说明整联蛋白受体 α_6 链的去磷酸化可能参与半桥粒的组装。调控整联蛋白受体磷酸化的胞内信号通路以及半桥粒的组装和解离正处于研究之中。

15.21 间隙连接允许相邻细胞间分子的直接传输

关键概念

- 间隙连接是一种蛋白结构，能促进相邻细胞间小分子的直接传输。它们存在于大多数动物细胞中。
- 间隙连接由圆筒状的连接通道集结而成，由质膜向外突出，跨越相邻细胞间 2～3nm 的间隙。
- 间隙连接通道由两部分组成，每部分称为连接小体或半通道，由称为连接蛋白的六个蛋白亚基组成。
- 人类有 20 多种不同的连接小体基因，它们组合形成多种类型的连接小体。
- 间隙连接允许 1200Da 大小的分子自由通过，2000Da 的分子则不能通过。
- 间隙连接的渗透性是由间隙连接通道的开闭调控的，这一过程叫做门控。胞内 pH、钙离子流量或连接小体亚基的直接磷酸化都影响门控。另外两种非连接小体的间隙连接蛋白家族已经被发现，说明间隙连接在动物界中进化了不止一次。

间隙连接是细胞表面的特化结构，能促进相邻细胞间离子和小分子的直接传输。它们存在于大多数脊椎动物和无脊椎动物细胞中，是动物细胞中唯一已知的细胞-细胞传输方式（植物细胞使用胞间连丝，见第17章植物细胞生物学）。心肌细胞的间隙连接也能促进肌肉收缩时电信号的传导。

间隙连接发现于20世纪60年代，研究者们发现相邻细胞间有电流直接通过，没有经过细胞间的胞外液体。这说明细胞通过一个通道交换带电离子和其他小分子，这一通道贯穿质膜，直接联系相邻细胞。支持这一观点的论据来自相邻细胞的电子显微图，显示相邻质膜间存在紧密贴近的2～3nm的缝隙。

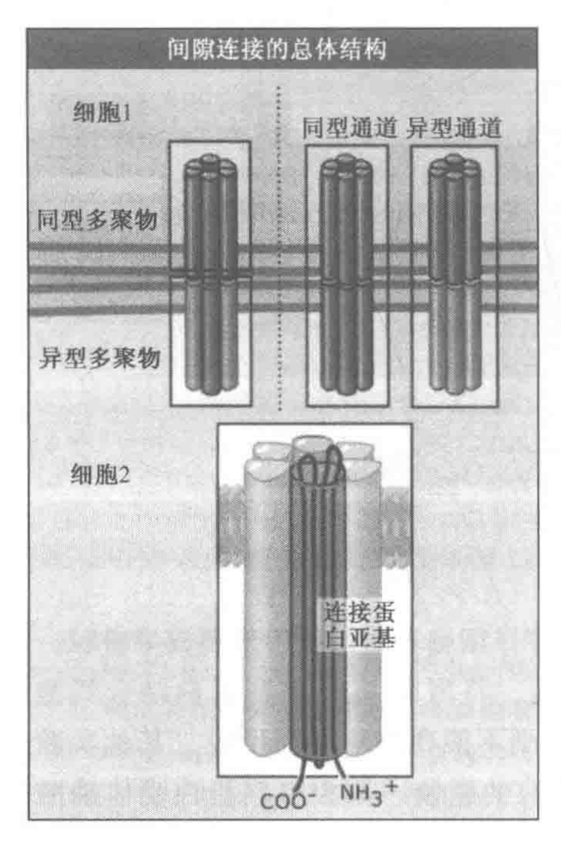


图15.57 间隙连接的基本结构单位是连接小体，包含6个跨膜的连接蛋白亚基。每个连接小体有17nm长，直径7nm。例如脑中的快速反射反应。

如图15.57所示，这些缝隙由**间隙连接通道**聚集成斑，如质膜的冰冻断层所示，通道从质膜上伸出相连。间隙连接可能包含几个或几千个间隙连接通道，其在细胞表面的直径可达几微米。间隙连接通道由两半组成，称为半通道或**连接小体**，胞间缝隙中连在一起。每个连接小体由六个蛋白亚基构成，称为**连接蛋白**。连接小体有17nm长，具亲水性，筒状通道最宽处直径7nm，最窄处直径3nm。通道的中央孔用负染技术可以观察到。连接蛋白亚基包含4个跨膜的α螺旋，由两个胞外环连接。高分辨结构显示，相对应的连接蛋白的胞外环通过反向平行β片彼此结合，从而形成β桶。

间隙连接通道组成多变，如图15.57所示。人类基因序列显示，人类至少有20种不同的连接蛋白。很多细胞表达不止一种连接蛋白，这就导致了同源低聚连接小体（仅由一种亚基组成）和异源低聚连接小体（包含多种亚基类型）的形成。除此之外，一种连接小体能和相同（同型通道）或不同组分（异型通道）的连接小体结合。单个间隙连接包含的连接小体可以由不同的连接蛋白组成。连接体内，连接小体可以是同种混合也可以根据连接蛋白的组成而在空间上分隔，如图15.58所示。

参与连接小体/连接小体集合、连接蛋白/连接蛋白识别和多聚化以及连接蛋白亚基相容性（选择性）的特异结构域已经得到鉴定。通过结合实验可识别这些结构域，利用缺乏特定区域的重组突变连接蛋白或不同型连接蛋白的区域嵌合体。不同域的功能正处于研究之中。

最初的实验是为了验证细胞利用通道进行小分子运输的假设，荧光分子注射到体外培养的生长细胞里。在不同时间点用显微镜追踪分子的扩散。这些实验表明相邻细胞间的分子扩散要远远快于预计中分子穿过两个质膜脂双层的速度。这个结果意味着相邻细胞间存在一个直接的通道联通它们的细胞质。这些通道后来被认定是间隙连接。通过使

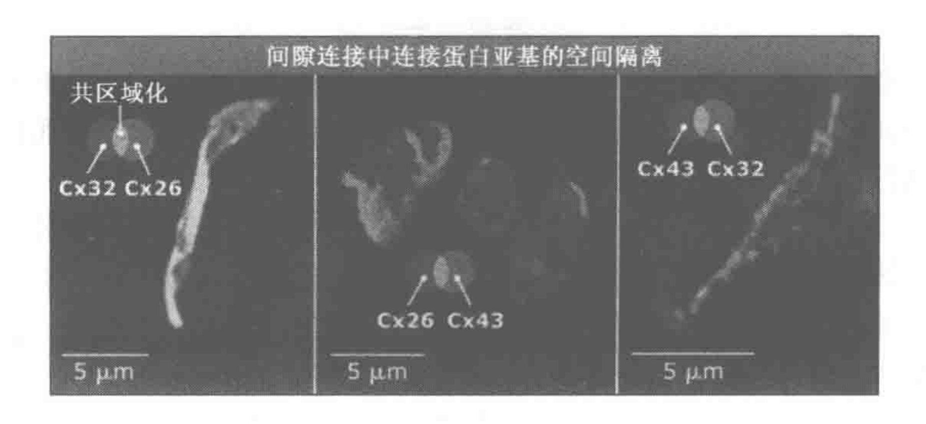


图 15.58 间隙连接小体中连接蛋白（Cx）亚基的双标记免疫荧光染色。细胞用已注明的成对连接蛋白基因转染，再用连接蛋白抗体染色。例如，Cx32 与 Cx26 共定位但不与 Cx43 共定位。细胞体未显示。照片由 Lehigh 大学的 Matthias Falk 惠赠。

用不同大小的荧光分子，确定间隙连接允许通过大至 1200Da 的分子（相当于直径 2nm 的分子），但排除了大于 2000Da 的分子。最近一项实验模型显示出表达连接蛋白的细胞间荧光分子的交换情况，如图 15.59 所示。

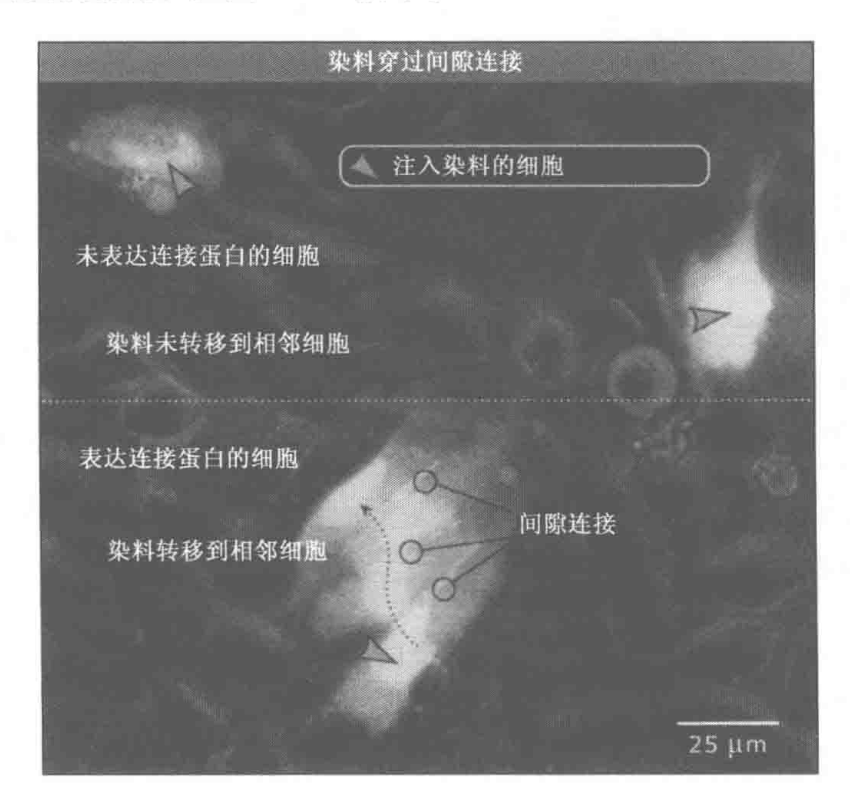


图 15.59 染色穿过间隙连接的荧光图。细胞用编码连接蛋白的 DNA 瞬时转染，因此不是所有的细胞都表达连接蛋白。照片由 Lehigh 大学的 Matthias Falk 惠赠。

这样的实验说明离子能通过间隙连接在细胞的胞质间隔间自由穿行。很多小分子，包括糖、核苷酸和第二信使分子，如 cAMP、cGMP 也能进行交换。在大量细胞的快速、协同反应中通过间隙连接的交流是十分关键的。例如，脑中的快速反射反应就是由间隙连接的神经元所介导的，能产生近乎瞬时的离子交换。严格定时控制的心肌纤维收

缩也是快速离子交换介导的。

间隙连接的通透性由通道的开关控制（这一过程称通道**门控**）。有一个很好的证据能证明间隙连接的通道门控是通过蛋白激酶磷酸化连接蛋白亚基，改变胞内 pH 和胞内钙离子浓度所控制的。例如，当钙离子浓度从 10^{-7} mol/L 上升到 10^{-5} mol/L，间隙连接的通透性就下降，高于 10^{-5} mol/L 的浓度会导致连接的完全关闭。这可能是一种自我保护机制，因为凋亡中的细胞会发生胞浆钙离子浓度的快速上升，间隙连接的关闭可以保护周围的细胞不会意外启动凋亡信号机制。

另有两种间隙连接家族蛋白被发现。Innexin（无脊椎动物连接蛋白）只存在于无脊椎动物中，除了名称外与连接蛋白没有太大的序列同源性。尽管如此，它们形成的细胞间连接从外形到功能都很像脊椎动物的间隙连接。以微管连接蛋白的术语为词根，就出现了第二个家族，pannexin（拉丁语 pan，意为全部）。Pannexin 同时存在于脊椎动物和无脊椎动物中，与连接蛋白以及 Innexin 的结构都不同。Pannexin 几乎完全存在于神经细胞中，说明它们可能在神经功能与发育，甚至在低等动物非常原始的神经系统中都有重要作用。这些观察也说明间隙连接在动物进化的过程中以完全独立的方式至少发生过两次，此过程称为趋同进化。

15.22 钙依赖的钙黏蛋白介导细胞间的粘连

关键概念

- 钙黏蛋白构成了细胞表面跨膜受体家族，共分为 8 类。
- 最清楚的一组钙黏蛋白是“经典钙黏蛋白”，它在建立与维持细胞间粘连复合体中有重要作用，如粘连连接。
- 经典钙黏蛋白是二聚体的集合，粘连的力度是通过改变细胞表面表达的二聚体数量和聚集的程度来调控的。
- 经典钙黏蛋白结合胞质接头蛋白，即连环蛋白，将钙黏蛋白连接到肌动蛋白细胞骨架上。
- 钙黏蛋白群通过形成细胞骨架的脚手架将信号蛋白及其底物组织成三维复合体，从而调控胞内信号。
- 经典钙黏蛋白对于组织的形态建成是必需的，主要控制特异性的细胞间连接和细胞形态及运动的变化。

钙黏蛋白超家族包括 70 多种结构相关蛋白，所有成员都有两个特征：这些蛋白的胞外区域都结合钙离子（因此得名钙）并适当地折叠；这些蛋白都结合其他蛋白（因此得名黏）。钙黏蛋白参与细胞间粘连、细胞迁移和信号转导。最早的钙黏蛋白发现于上皮细胞的带状连接（见 15.18 粘连连接将相邻细胞连接在一起）。现在用“经典钙黏蛋白”来区别与其相关性较小的家族成员。

所有的经典钙黏蛋白都是跨膜受体，有单个跨膜结构域，蛋白 N 端是 5 个胞外结构域，C 端尾部是保守的胞质结构域，如图 15.53 所示。在无脊椎动物中，五种经典钙黏蛋白命名为：E-，P-，N-，R-和 VE-钙黏蛋白，分别基于它们最初发现的位点：上皮组织、胎盘、神经、视网膜和血管内皮。我们现在知道每种类型的表达都更加广泛，但名字一直沿用下来。

经典钙黏蛋白通过细胞表面的二聚体的聚合行使功能（见图 15.53）。这些二聚体

结合到相邻细胞的相同二聚体上（称为**嗜同种结合**）。N-型和 R-型钙黏蛋白也能彼此结合（称为**嗜异染结合**）。细胞能通过亲合力调整控制吸附力，即同时改变细胞表面受体的总数和质膜内受体的旁向扩散。没有聚集的钙黏蛋白不能与相邻细胞形成强的粘连（见 15.18 粘连连接将相邻细胞连接在一起）。

有直接的证据说明钙黏蛋白在细胞间粘连中聚集的重要性。提供这些证据的实验基于这样一个事实，即钙黏蛋白胞质尾部对二聚化作用的重要性。如图 15.60 所示，将包含钙黏蛋白受体胞外结构域、跨膜结构域及不相关蛋白 FKBP12 胞质尾组成重组嵌合蛋白，使之在正常情况彼此不结合的细胞中表达。由于 FKBP12 胞质尾不能彼此结合，嵌合蛋白不形成二聚体，结果细胞不发生聚集。然而加入一种化学物质连接 FKBP12 的胞质尾，就能使嵌合蛋白的粘连蛋白部分彼此靠近，形成二聚体群，这时细胞发生彼此粘连。

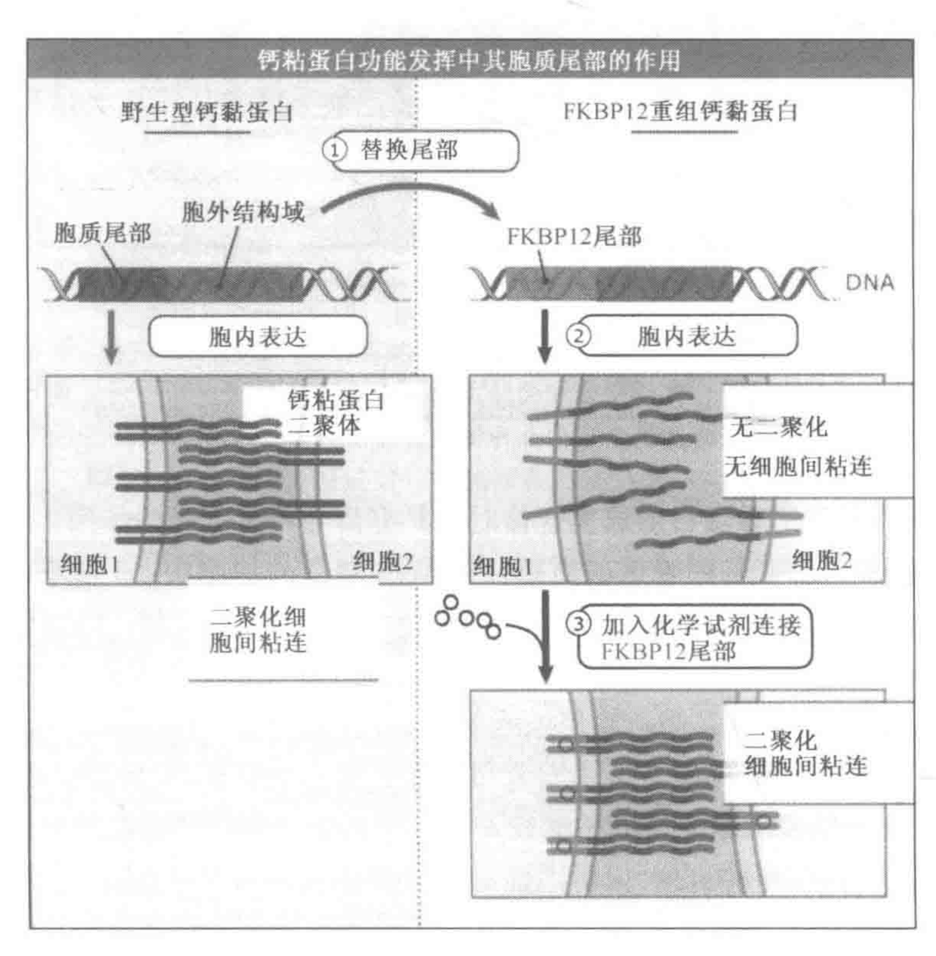


图 15.60 钙黏蛋白的胞质尾部对于胞外结构域介导的粘连至关重要。

经典钙黏蛋白保守胞质尾 C 端有一个含 56 个氨基酸的区域，它能结合胞质蛋白：β **连环蛋白**。β 连环蛋白附着在钙黏蛋白上时，作为一个接头蛋白结合 α **连环蛋白**，α 连环蛋白又进一步结合肌动蛋白丝，如图 15.61 所示（β 连环蛋白和 α 连环蛋白没有序列相关性）。因此，β 连环蛋白是细胞表面钙黏蛋白二聚体和肌动蛋白细胞骨架之间蛋白链的链环。正如我们看到的那样，破坏二聚体的形成就是破坏链条中的一个链环，会导致细胞粘连的减少。另一个这一链条破坏的实验如图 15.61 所示。一个突变的 β 连环蛋白基因缺失了编码 α 连环蛋白结合位点的序列，表达这一基因的

细胞则不能彼此粘连。这是因为突变的β连环蛋白能结合钙黏蛋白胞质尾，但不能连接α连环蛋白。

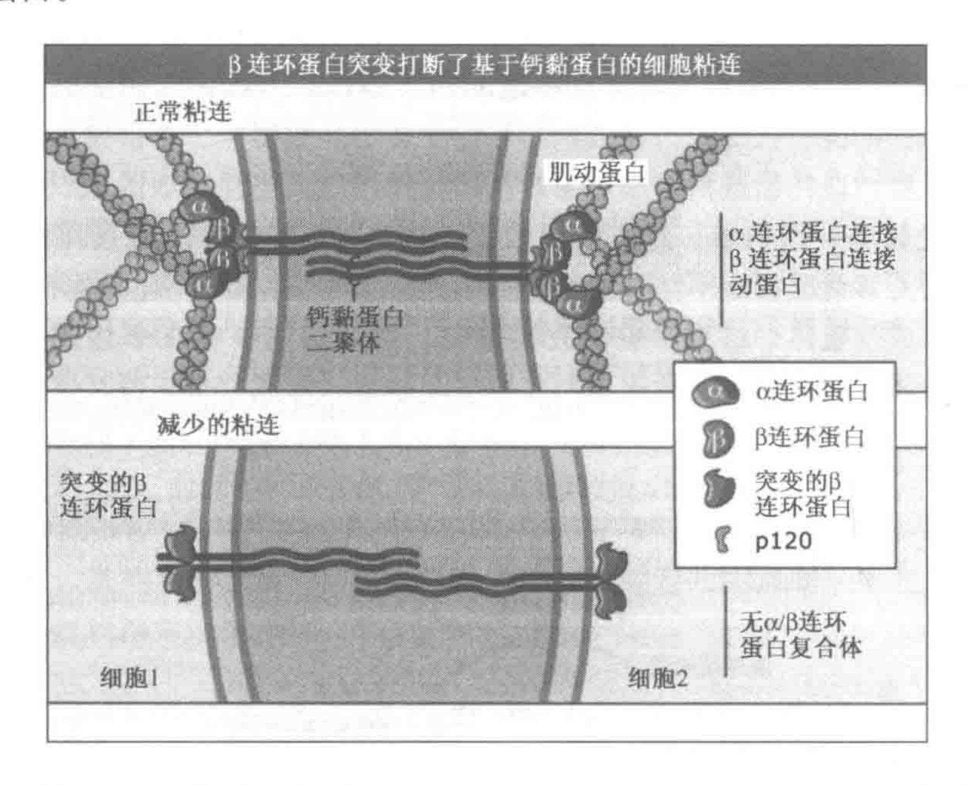


图 15.61 钙黏蛋白胞质尾部通过连环蛋白连接到肌动蛋白丝上。钙黏蛋白复合体还包含其他接头和信号蛋白（未显示）。β连环蛋白的α连环蛋白结合域是正常的钙黏蛋白介导细胞连接所必需的。

β连环蛋白不与钙黏蛋白形成复合体时，具有信号转导方面的作用，特别是与生长因子 Wnt 相联系，改变基因表达的通路。在 Wnt 刺激的细胞中，β连环蛋白不结合钙黏蛋白和α连环蛋白，而是结合转录因子。β连环蛋白进入细胞核，结合转录因子，控制细胞生长所需基因的表达。钙黏蛋白被认为能通过隔离粘连复合体中的β连环蛋白，限制 Wnt 生长因子的活性，间接控制细胞的生长。

结合钙黏蛋白胞质尾的第二个主要蛋白是信号接头蛋白 $p120^{CAS}$，如图 15.61 所示。这个蛋白也是 Src 酪氨酸激酶家族的底物，在基于钙黏蛋白的粘连连接中被发现。钙黏蛋白群中还有其他的信号蛋白，说明钙黏蛋白可能直接参与信号转导。事实上，β连环蛋白是被 Src 酪氨酸激酶磷酸化的。然而没有证据表明钙黏蛋白本身是信号蛋白。这更可能是因为钙黏蛋白能与细胞骨架和信号接头如 $p120^{CAS}$发生作用，钙黏蛋白及其形成的连接能作为组织信号分子的支架，调控它们的活性。相互作用信号蛋白复合体的形成是信号转导过程中的常见课题，例如整联蛋白受体聚集体相关的局部粘连（见 15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导）。以此类推：钙黏蛋白可能是配电盘，而不是电话机。

经典钙黏蛋白在发育过程中有重要的作用，能控制细胞间的黏附力，提供特异性的细胞识别机制。比如在发育过程中，胚泡形成时表达 E 钙黏蛋白，它可能在发育胚胎的紧密连接形成和其后的上皮细胞极化过程中增加细胞的粘连。不出意料，E 钙黏蛋白的基因敲除在早期的发育中是致命的。

钙黏蛋白家族其他成员的功能突变或基因敲除也会影响多种器官的发育，包括脑、脊髓、肺和肾。所有这些发育事件共同的一个重要课题就是细胞的移动过程，如**内陷**。例如，脊椎动物早期的神经组织的发生是构成外胚层的细胞沿着胚胎外表面形成一道脊，加深成为一道裂缝，再修整成为神经管。为了形成这一神经管，上皮细胞必须缩小顶面区域，向内弯折，之后解离，移到新的位置闭合这一管道，如图 15.62 所示。类似的移动还发生在许多外胚层起源的组织上，它们都需要细胞间接触的变化。缺失钙黏蛋白基因会导致多种发育异常，如神经元错位导致的运动技巧低下，这也可能来自上皮细胞内陷时的错误。

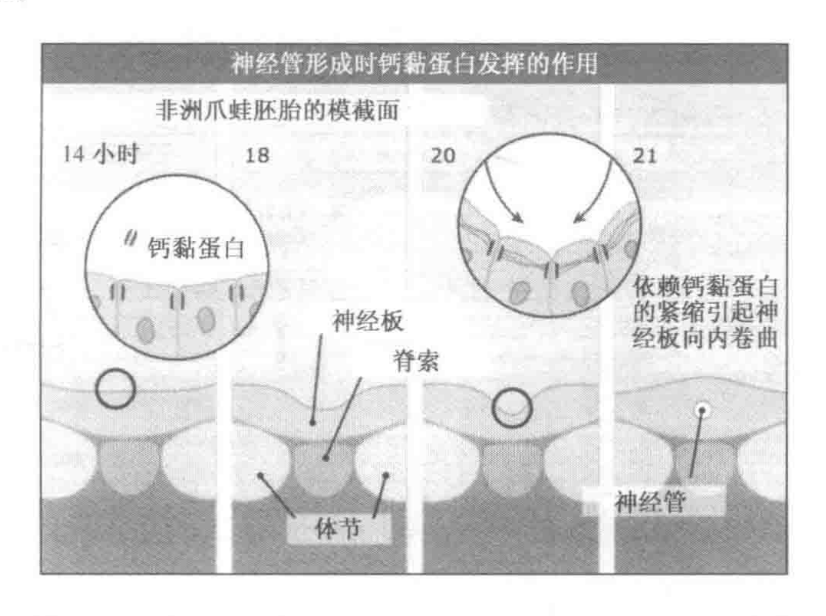


图 15.62　神经管形成时，神经板细胞的上表面收缩，致使神经板向内卷曲。

15.23　钙依赖的 NCAM 介导神经细胞间的粘连

关键概念

- 神经细胞粘连分子（NCAM）只在神经细胞中表达，其主要功能是作为同型细胞间粘连和信号的受体。
- 神经细胞表达 3 种不同类型的 NCAM 蛋白，它们产生于同一 NCAM 基因的不同剪切。
- 一些 NCAM 带有多聚唾液酸（PSA）长链的共价修饰，它们能减小同型结合力。这种吸附力的减小可能在神经元发育中对神经元间接触的建成及瓦解非常重要。

一些细胞粘连蛋白，如钙黏蛋白和整联蛋白，必须结合细胞外的钙离子才能起始粘连过程，但也有些蛋白例外。一种不依赖于钙的细胞粘连蛋白主要类型是**神经细胞粘连分子（NCAM）**。NCAM 主要是作为细胞间粘连受体，也能结合类肝素硫酸盐蛋白多糖。NCAM 只在神经细胞中表达。它们在中枢神经系统和外周神经系统的相邻细胞连接中都存在，特别是在神经纤维中。

神经细胞表达 3 种不同的 NCAM 蛋白，它们是同一 NCAM 基因通过不同剪切形成的。NCAM 属于免疫球蛋白（Ig）超家族，包含一个特征结构组件，称为**免疫球蛋**

白结构域。Ig 结构域是由近 100 个氨基酸以两个 β 片的形状形成的一个环路。所有这三种 NCAM 的氨基端都包含 5 个这样的 Ig 结构域环及 2 个Ⅲ型纤连蛋白模块，如图 15.63 所示。NCAM-180 和 NCAM-140（数字代表蛋白的 kDa 大小）包含一个跨膜结构域，C 端胞质尾不同。与此不同的是 NCAM-120 通过一个糖基磷脂酰肌醇尾部锚定在细胞表面。NCAM 所有的三种类型都能通过蛋白降解从细胞表面清除——NCAM-120、NCAM-180 和 NCAM-140，NCAM-120 是通过脑脊液和质膜扩散释放的可溶性分子磷脂酶。可溶性 NCAM 能促进神经细胞的粘连和轴突的外生（轴突从神经细胞胞体的延伸）。

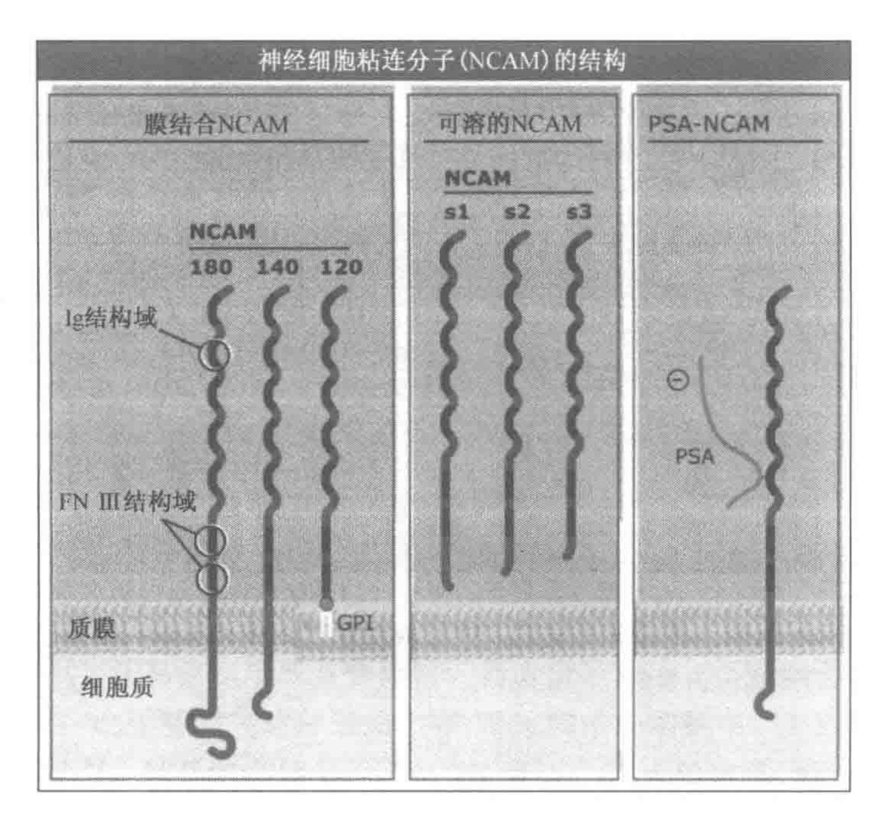


图 15.63 NCAM 产生于不同大小的膜结合蛋白质和可溶性蛋白质。图中显示了 NCAM 的结构组成。NCAM 的胞外部分可以通过添加多聚唾液酸修饰（PSA），PSA 是在通过分泌通路时连接到天门冬氨酸残基上的（图示是 PSA-NCAM 的 140kDa 跨膜形式模型）。

细胞表面的 NCAM 可以作为信号受体，能结合成纤维细胞生长因子受体的特异区域。这种细胞表面的侧面关联会导致表面钙离子通道的开放，可能是通过包含磷脂酶 C、二酯甘油和花生四烯酸的一条信号通路。至少一种 NCAM，NCAM-140 能和非受体酪氨酸激酶 $p59^{fyn}$ 相关联，$p59^{fyn}$ 能连接受体，激活局部粘连激酶。因此，NCAM 受体激活的信号通路和其他细胞表面受体有重合。这一信号的确切功能还不知道。

在内质网合成之后，NCAM 在通往细胞表面的路径上在高尔基体中经过多种翻译后修饰。这些修饰包括磷酸化、硫酸化和糖基化，其中最重要的恐怕就是线状唾液酸糖长链，**多聚唾液酸（PSA）**的添加。PSA 加到第 5 个 Ig 结构域的两个天门冬氨酸的 N 端糖基上，如图 15.63 所示。

PSA 链的添加明显地改变了 NCAM 的形状和功能。由于唾液酸带有负电，PSA 从 NCAM 蛋白上伸出，吸引阳离子，结合水分子，类似于蛋白多糖上葡萄糖胺聚糖的情况。PSA 链添加到 NCAM 后最显著的效应表现在受体的吸附功能上。膜联合的 NCAM 主要结合相邻细胞上相同的 NCAM 受体。这种嗜同种结合的精确机制还不清楚，但确实涉及每个受体氨基端的 Ig 结构域。近来关于这种相互作用的一个模型显示，NCAM 受体的所有 5 个 Ig 结构域重叠，导致了相邻细胞间稳定与有力的黏附。然而，PSA-NCAM 并不完全重叠，可能是因为 PSA 链的大体积水合和负电荷排斥了相邻细胞互补受体的 Ig 结构域，如图 15.64 所示。结果，表达 PSA-NCAM 的细胞对相邻细胞的结合力要弱于只表达 NCAM 缺乏 PSA 的细胞。

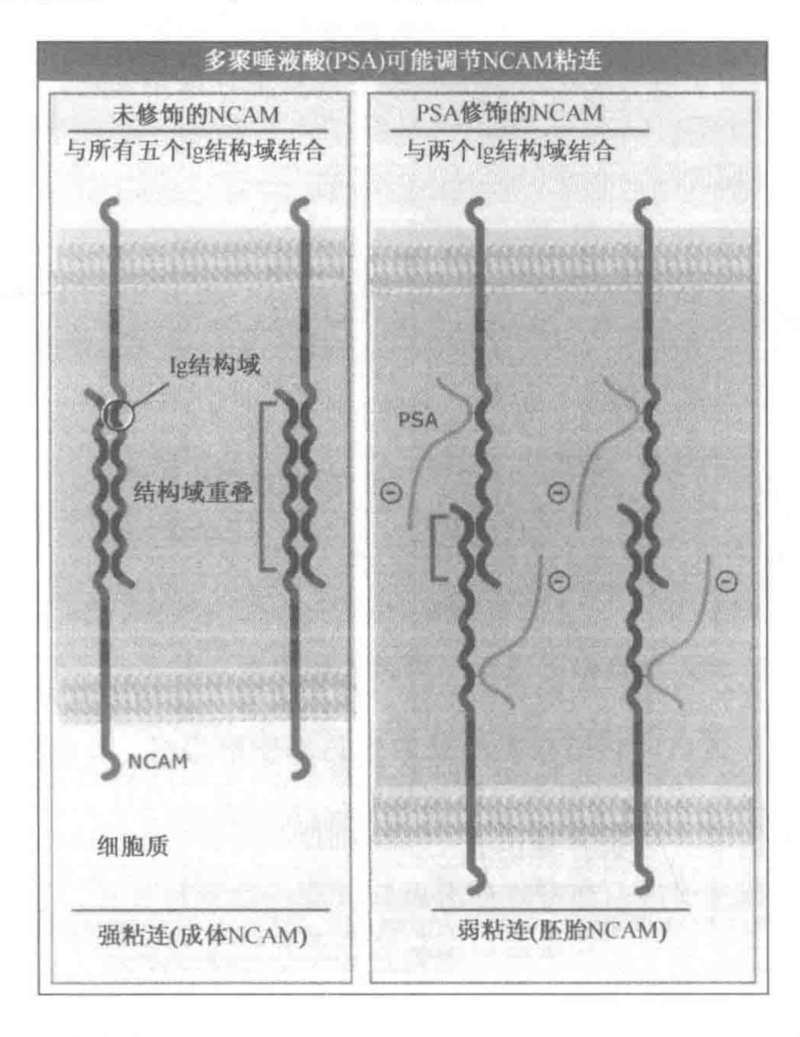


图 15.64　未修饰的 NCAM 能与 5 个 Ig 结构域彼此结合，导致强有力的细胞间粘连。PSA 修饰的 NCAM 仅与 2 个 Ig 域结合，减小了细胞间的吸附力。PSA 的存在干扰了 NCAM 的重叠，导致发育期间细胞间粘连的削弱。在成体内，PSA 不加到 NCAM 上，因此得到的细胞连接是牢固的。

同种受体同时拥有强与弱结合形式的好处是什么？联系到发育过程，细胞必须在体内生长并来回移动才能形成组织。这一过程发生时，细胞间的接触必须多次建成并再瓦解。这对于要在成熟个体中形成多种高度特异连接的细胞，如神经细胞来说就更是如此。因而，像 PSA-NCAM 细胞之间这样低亲和力但高特异性的相互作用对发育中的神经元是相当有用的。

直接证明 PSA 控制神经细胞发育是相当困难的。但仍然有几条证据证明这一观点：

组织免疫学实验，通过 NCAM 和 PSA-NCAM 的特异性识别抗体说明，胚胎小鼠中约有 30%的 NCAM 表达 PSA，而在成体中这一数字降到了 10%。

合成 PSA 的两个酶，唾液酸转移酶-Ⅹ和多唾液酸转移酶主要在胚胎神经组织中表达。

在发育动物中通过使用剪切 PSA 链的酶或注射 PSA-NCAM 的抗体干扰 PSA-NCAM 的功能会导致脑的畸形。

NCAM 基因完全敲除的小鼠也会发生类似的脑畸形。

NCAM 在成年动物神经元的重排上也有重要作用，因为它们允许了神经连接的重组。PSA-NCAM 对于学习和记忆过程中脑的物理重塑也很重要。这一观点的支持证据来自对啮齿动物的观察，PSA-NCAM 水平在学习后增加，而从 NCAM 上去除 PSA（通过注射内皮唾液酸蛋白）会使记忆测试的表现下降。

15.24 选择蛋白控制循环免疫细胞的粘连

关键概念

- 选择蛋白是细胞间粘连受体，仅在血管系统的细胞中表达。三种形式的选择蛋白，L-，P-，E-选择蛋白已经分别得到鉴定。
- 选择蛋白的功能是滞留血管中循环的白细胞，使之能迁移进入周围组织。
- 在不连续的细胞粘连过程中，白细胞上的选择蛋白瞬时微弱地结合到内皮细胞的糖蛋白上，致使白细胞沿着血管壁达到“滚动停止”。

选择蛋白是高度特异性的细胞表面受体，仅在血管系统的细胞中表达。目前已经识别了三种不同的选择蛋白，它们根据所处的表达细胞而得名：L-选择蛋白（白细胞）、P-选择蛋白（血小板）、E-选择蛋白（内皮细胞）。内皮细胞在炎症期间被细胞因子激活后能在表面同时表达 P-，E-选择蛋白。

选择蛋白的功能是促进白细胞移动出血管（这一过程称外渗），进入发炎组织，参与免疫反应。这是一个难题：外渗的白细胞必须首先粘连到血管壁上，克服血流施加的冲击力。白细胞应该如何解决这一问题？答案极其简单：它们发生了由选择蛋白介导的“滚动停止”。它们能以这种方式逐渐减小在血管中的速度。当它们停止时，白细胞连接内皮细胞表面的整联蛋白受体。这些受体增加了吸附力，辅助白细胞从血管的逸出（整联蛋白见 15.13 大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体）。

一个细胞如何能在血管中滚动停止？这个细胞必须能与血管壁上的内皮细胞形成短暂与可逆的粘连作用。当白细胞形成这些联合时，它沿着血管壁拖动（或滚动）直到形成足够的连接以达到完全停止。这就是**不连续细胞粘连**。如图 15.65 所示，白细胞表达连接蛋白配基，这样它们就只结合表面表达 P-，E-选择蛋白的内皮细胞，而不能粘连到非炎症组织的血管壁上。

这一选择性粘连的关键是利用了蛋白-糖的结合相互作用，如同蛋白多糖及其受体用到的机制。选择蛋白如此命名是因为：这些受体的配基结合部分类似于凝集素，一种

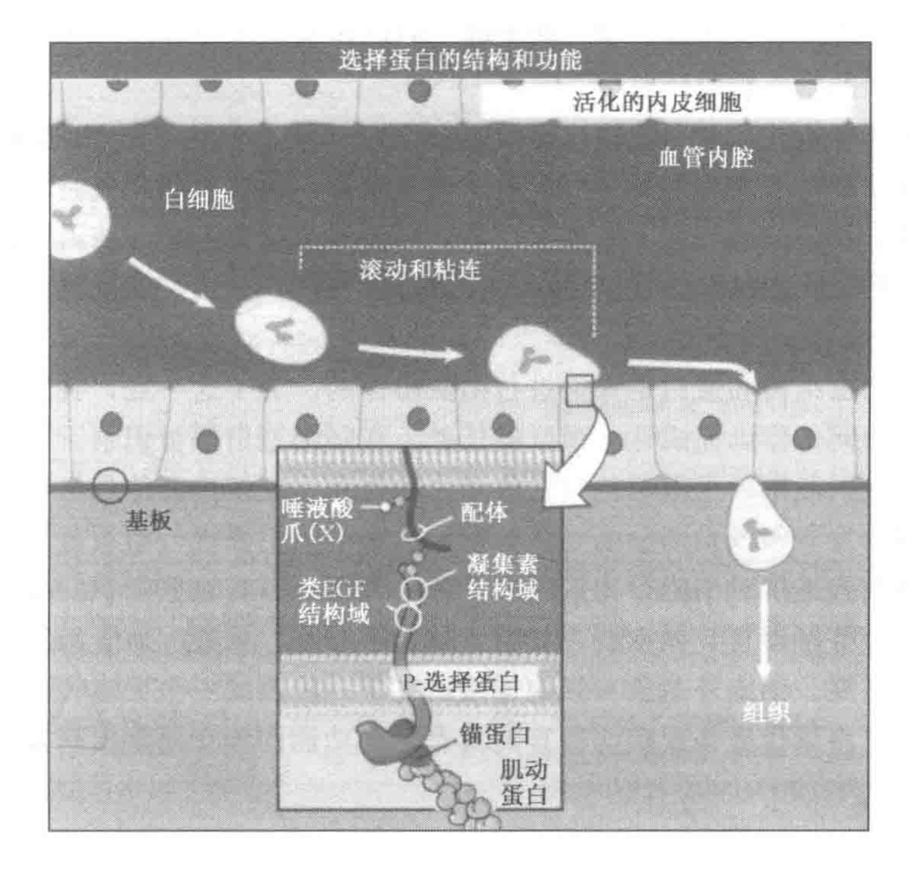


图 15.65 选择蛋白“滚动停止”功能的图解。插图：选择蛋白结构组织模型与白细胞配基的结合。

特异性结合细胞表面低聚糖的蛋白（如图 15.65）。选择蛋白的配基结合部分在蛋白的 N 端，依次连接着一串短重复序列、单跨膜结构域和 C 端短胞质结构域。像钙黏蛋白和整联蛋白受体一样，选择蛋白需要胞外钙离子才能正确折叠及结合配基。

选择蛋白结合一种复杂的，由唾液酸和岩藻糖特异排列的复合体，叫做**唾液酸爪（sLe^x）**，它能结合靶细胞表面表达的载体蛋白。选择蛋白能敏锐地区分不同形式的 sLe^x，sLe^x 结合不同的核心蛋白，从而能建立高度的结合特异性。主要的连接蛋白配基包括 P-选择蛋白糖蛋白配基 1（PSGL-1）、糖基化依赖的细胞粘连分子-1（GlyCAM-1）、黏膜地址素细胞粘连分子-1（MadCAM-1）。有一些推测认为这些配基的结合能激活胞内信号通路，辅助外渗后期整联蛋白受体的活化，但这一点尚未证实。

15.25 展望

正如我们在本章之初提到的那样，细胞外基质和细胞连接的研究在过去的 100 年间取得了相当大的进步（见图 15.3）。我们现在知道了这些结构的主要组成，对它们的结构和功能有了相当的了解。分子遗传学的最新进展带着我们考察了这些分子在发育过程中的作用。

当我们讨论这一领域下一步做什么时，让我们先来看一个非常实际的例子。看看你的手，将其左右移动，用手指轻叩桌面，猛咬你的手指，思考这些手指令人惊叹的复杂性。几十亿个细胞组成了你手上的组织。这些细胞由细胞外基质和细胞连接支持并联系着。为了理解整个手是如何工作的，我们需要了解它的组成是什么，它们如何相互作

用，它们如何完成各自的功能？这一浩大的工程已经被应用于各种器官，如心脏或肝脏的细胞外基质和细胞连接的研究中。

迄今为止，细胞外基质和细胞连接的研究已经认知了多种不同类型的结构和蛋白。我们现在知道几百种不同类型的蛋白组成了这些结构，而这可能只代表了这些结构中的部分蛋白。由于我们已经临近了细胞生物学研究这一阶段的末期，基因组学和蛋白质组学技术的使用将使我们能够识别组织中存在的每种蛋白，甚至可能推测我们所发现蛋白的功能。

我们需要知道结构和蛋白是如何进行团队协作的。为了这一点，我们需要观察大量的细胞交流和协同工作以完成这一艰巨的任务。在每个蛋白都被识别后，细胞生物学浩大的工程终将告一段落，可以对包含这些蛋白的器官和组织进行体外组装。

组织工程的发展领域是部分基于基础细胞生物学，主要进行组织重建。随着我们对细胞外基质和细胞连接对细胞行为控制的了解，我们可以将这些知识应用到实验室真实组织的创造上。替换器官，如皮肤、骨骼、软骨、肝脏、角膜、血管甚至脊髓的发育研究已经取得了进展。细胞外基质和细胞连接研究下一阶段的一个标志将是从前获得的基本知识的拓展，将取代受伤或疾病器官的具有完全功能的器官研发出来。

15.26 总结

细胞外基质包含上百种不同的分子，以复杂而高度有序的方式相互作用。细胞外基质中两种主要的分子是结构糖蛋白（如胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白）和蛋白多糖（如类肝素硫酸盐蛋白多糖），它们影响着结构稳定性，并为组织提供亲水环境。每种分子都有几个结构模块，能介导细胞受体、生长因子和其他细胞外基质分子的连接。这些分子通过决定细胞在组织中的三维排列、激活胞内信号通路、提供组织迁移的底层来控制细胞的行为。我们也知道这些基质的组分会随时间改变，相关细胞在特定信号的作用下会产生、降解这些基质。

在联合形成特异性细胞表面复合体、介导细胞间连接和与胞外基质连接的蛋白中，至少有 100 种已经得到了鉴定。这些复合体有多种特化的功能。紧密连接和分隔连接调控上皮细胞层的细胞侧向运输；粘连连接和局部粘连连接细胞表面和肌动蛋白细胞骨架，从而控制细胞运动；桥粒和半桥粒连接细胞表面和中间纤维网，从而提供结构稳定性，使张力沿着网面分布。这些复合体很多都包含信号蛋白，能和细胞内部交流，调控多种细胞功能，比如生长。这些信号网络的组织是高度复杂的。

但这些分子是如何联合起来形成一种完整功能的？这是细胞生物学下一阶段的挑战。这一方向的里程碑已经清晰可见了：在一些例子中我们已经识别了一种结构的大多数分子组分（如基底膜），现在重点转移到这些分子是如何相互作用，形成一种功能组织。我们已经将一个细胞结构，如基底膜还原为它的组成部分，现在就要试图将各个部分放回一起，形成一个功能单位，如替代皮肤。组织工程学领域就是要将这些知识应用到人工生物结构本身上，它将在细胞生物学进展的第四个研究阶段发挥主要作用。

参考文献

15.1 导言

综述

Haralson, M. A., and Hassell, J. R., 1995. *Extra cellular Matrix: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.

Hay, E. D., 1999. Biogenesis and organization of extracellular matrix. *FASEB J.* v. 13 Suppl 2 p. S281 – S283.

Hynes, R. O., 1999. Cell adhesion: Old and new questions. *Trends Cell Biol.* v. 9 p. M33–M37.

Kaiser, D., 2001. Building a multicellular organism. *Annu. Rev. Genet.* v. 35 p. 103–123.

Ko, K. S., and McCulloch, C. A., 2001. Intercellular mechanotransduction: Cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 285 p. 1077–1083.

15.3 胶原蛋白支撑着组织结构

综述

Gullberg, D. E., and Lundgren-Akerlund, E., 2002. Collagen-binding I domain integrins—what do they do? *Prog. Histochem. Cytochem.* v. 37 p. 3–54.

Holmes, D. F., Graham, H. K., Trotter, J. A., and Kadler, K. E., 2001. STEM/TEM studies of collagen fibril assembly. *Micron* v. 32 p. 273–285.

Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., and Chapman, J. A., 1996. Collagen fibril formation. *Biochem. J.* v. 316 (Pt 1) p. 1–11.

Myllyharju, J., and Kivirikko, K. I., 2001. Collagens and collagen-related diseases. *Ann. Med.* v. 33 p. 7–21.

van der Rest, M., and Garrone, R., 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J.* v. 5 p. 2814–2823.

15.4 纤连蛋白将细胞与成胶原基质相连

综述

Potts, J. R., and Campbell, I. D., 1996. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol.* v. 15 p. 313–320.

Romberger, D. J., 1997. Fibronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 29 p. 939–943.

Schwarzbauer, J. E., and Sechler, J. L., 1999. Fibronectin fibrillogenesis: A paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 11 p. 622–627.

Watt, F. M., and Hodivala, K. J., 1994. Cell adhesion. Fibronectin and integrin knockouts come unstuck. *Curr. Biol.* v. 4 p. 270–272.

研究

Hirano, H., Yamada, Y., Sullivan, M., de Crombrugghe, B., Pastan, I., and Yamada, K. M., 1983. Isolation of genomic DNA clones spanning the entire fibronectin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 80 p. 46–50.

Isemura, M., Yosizawa, Z., Takahashi, K., Kosaka, H., Kojima, N., and Ono, T., 1981. Characterization of porcine plasma fibronectin and its fragmentation by porcine liver cathepsin B. *J. Biochem. (Tokyo)* v. 90 p. 1–9.

Peltonen, J., Jaakkola, S., Lask, G., Virtanen, I., and Uitto, J., 1988. Fibronectin gene expression by epithelial tumor cells in basal cell carcinoma: An immunocytochemical and in situ hybridization study. *J. Invest. Dermatol.* v. 91 p. 289–293.

Ryu, S., Jimi, S., Eura, Y., Kato, T., and Takebayashi, S., 1999. Strong intracellular and negative peripheral expression of fibronectin in tumor cells contribute to invasion and metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Lett* v. 146 p. 103–109.

15.5 弹性纤维维持组织柔韧性

综述

Debelle, L., and Tamburro, A. M., 1999. Elastin: mMolecular description and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 31 p. 261–272.

研究

Brown-Augsburger, P., Broekelmann, T., Rosenbloom, J., and Mecham, R. P., 1996. Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly. *Biochem. J.* v. 318 (Pt 1) p. 149–155.

Brown-Augsburger, P., Chang, D., Rust, K., and Crouch, E. C., 1996. Biosynthesis of surfactant protein D. Contributions of conserved NH2-terminal cysteine residues and collagen helix formation to assembly and secretion. *J. Biol. Chem.* v. 271 p. 18912–18919.

Brown-Augsburger, P., Hartshorn, K., Chang, D., Rust, K., Fliszar, C., Welgus, H. G., and Crouch, E. C., 1996. Site-directed mutagenesis of Cys-15 and Cys-20 of pulmonary surfactant protein D. Expression of a trimeric protein with altered anti-viral properties. *J. Biol. Chem.* v. 271 p. 13724–13730.

Hinek, A., and Rabinovitch, M., 1994. 67-kD elastin-binding protein is a protective "com-

panion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J. Cell Biol.* v. 126 p. 563–574.

Jensen, S. A., Reinhardt, D. P., Gibson, M. A., and Weiss, A. S., 2001. Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 39661–39666.

Zhang, M. C., He, L., Giro, M., Yong, S. L., Tiller, G. E., and Davidson, J. M., 1999. Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (ELN). *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 981–986.

15.6 层粘连蛋白为细胞提供连接底物

综述

Aumailley, M., and Smyth, N., 1998. The role of laminins in basement membrane function. *J. Anat.* v. 193 (Pt 1) p. 1–21.

Belkin, A. M., and Stepp, M. A., 2000. Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.* v. 51 p. 280–301.

Colognato, H., and Yurchenco, P. D., 2000. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* v. 218 p. 213–234.

Engvall, E., and Wewer, U. M., 1996. Domains of laminin. *J. Cell Biochem.* v. 61 p. 493–501.

Ryan, M. C., Christiano, A. M., Engvall, E., Wewer, U. M., Miner, J. H., Sanes, J. R., and Burgeson, R. E., 1996. The functions of laminins: Lessons from *in vitro* studies. *Matrix Biol.* v. 15 p. 369–381.

Wewer, U. M., and Engvall, E., 1996. Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* v. 6 p. 409–418.

15.7 玻璃粘连蛋白在凝血过程中促进靶细胞的黏着

综述

Preissner, K. T., 1989. The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune systems. *Blut* v. 59 p. 419–431.

Schvartz, I., Seger, D., and Shaltiel, S., 1999. Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 31 p. 539–544.

研究

Podor, T. J., Campbell, S., Chindemi, P., Foulon, D. M., Farrell, D. H., Walton, P. D., Weitz, J. I., and Peterson, C. B., 2002. Incorporation of vitronectin into fibrin clots. Evidence for a binding interaction between vitronectin and γ A/γ′ fibrinogen. *J. Biol. Chem.* v. 277 p. 7520–7528.

Zhuang, P., Blackburn, M. N., and Peterson, C. B., 1996. Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. I. Biophysical characterization of protein unfolding and multimerization. *J. Biol. Chem.* v. 271 p. 14323–14332.

15.8 蛋白多糖参与组织水合作用

综述

Bottaro, D. P., 2002. The role of extracellular matrix heparan sulfate glycosaminoglycan in the activation of growth factor signaling pathways. *Ann. NY Acad. Sci.* v. 961 p. 158.

Iozzo, R. V., 1998. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* v. 67 p. 609–652.

Schwartz, N., 2000. Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans. *Front. Biosci.* v. 5 p. D649–D655.

研究

Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E., and Iozzo, R. V., 1997. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* v. 136 p. 729–743.

Hedlund, H., Hedbom, E., Heinegård, D., Mengarelli-Widholm, S., Reinholt, F. P., and Svensson, O., 1999. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 5777–5781.

15.9 透明质烷是结缔组织中含量丰富的葡萄糖胺聚糖

综述

Isacke, C. M., and Yarwood, H., 2002. The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 34 p. 718–721.

Lee, J. Y., and Spicer, A. P., 2000. Hyaluronan: A multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 12 p. 581–586.

Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., and Faitelson, Y., 2002. CD44 in cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* v. 39 p. 527–579.

研究

Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y. W., 2000. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 1829–1838.

Jacobson, A., Brinck, J., Briskin, M. J., Spicer, A. P., and Heldin, P., 2000. Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem. J.* v. 348 Pt 1 p. 29–35.

Oliferenko, S., Kaverina, I., Small, J. V., and Huber, L. A., 2000. Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J. Cell Biol.* v. 148 p. 1159–1164.

15.10 硫酸类肝素蛋白多糖是细胞表面复合受体

综述

Baeg, G. H., and Perrimon, N., 2000. Functional

binding of secreted molecules to heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila*. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 12 p. 575–580.
Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M., 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* v. 68 p. 729–777.

15.11 基底膜是特化的细胞外基质

综述

Yurchenco, P. D., and Cheng, Y. S., 1994. Laminin self-assembly: A three-arm interaction hypothesis for the formation of a network in basement membranes. *Contrib. Nephrol.* v. 107 p. 47–56.
Yurchenco, P. D., and O'Rear, J. J., 1994. Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 6 p. 674–681.

研究

DiPersio, C. M., Hodivala-Dilke, K. M., Jaenisch, R., Kreidberg, J. A., and Hynes, R. O., 1997. alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J. Cell Biol.* v. 137 p. 729–742.
Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M., and Martin, G. R., 1979. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* v. 254 p. 9933–9937.

15.12 蛋白酶降解细胞外基质成分

综述

Ivaska, J., and Heino, J., 2000. Adhesion receptors and cell invasion: Mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 57 p. 16–24.
Johansson, N., Ahonen, M., and Kahari, V. M., 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 57 p. 5–15.
McLane, M. A., Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., Wierzbicka-Patynowski, I., and Niewiarowski, S., 1998. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 219 p. 109–119.
Mott, J. D., and Werb, Z., 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 558–564.
Primakoff, P., and Myles, D. G., 2000. The ADAM gene family: Surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* v. 16 p. 83–87.
Ravanti, L., and Kahari, V. M., 2000. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int. J. Mol. Med.* v. 6 p. 391–407.
Shapiro, S. D., 1998. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 10 p. 602–608.

研究

Al-Aqeel, A. I., 2005. Al-Aqeel Sewairi syndrome, a new autosomal recessive disorder with multicentric osteolysis, nodulosis and arthropathy. The first genetic defect of matrix metalloproteinase 2 gene. *Saudi. Med. J.* v. 26 p. 24–30.
Arumugam, S., Jang, Y. C., Chen-Jensen, C., Gibran, N. S., and Isik, F. F., 1999. Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair. *Surgery* v. 125 p. 587–593.
Martignetti, J. A., et al., 2001. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat. Genet.* v. 28 p. 261–265.
Zankl, A., Bonafé, L., Calcaterra, V., Di Rocco, M., and Superti-Furga, A., 2005. Winchester syndrome caused by a homozygous mutation affecting the active site of matrix metalloproteinase 2. *Clin. Genet.* v. 67 p. 261–266.

15.13 大多数整联蛋白是细胞外基质蛋白的受体

综述

Mould, A. P., and Humphries, M. J., 2004. Regulation of integrin function through conformational complexity: Not simply a knee-jerk reaction? *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 544–551.
Schwartz, M. A., 2001. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* v. 11 p. 466–470.
Sheppard, D., 2000. *In vitro* functions of integrins: Lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* v. 19 p. 203–209.

15.14 整联蛋白受体参与细胞信号转导

综述

Arnaout, M. A., 2002. Integrin structure: New twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunol. Rev.* v. 186 p. 125–140.
Gilmore, A. P., and Burridge, K., 1996. Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure* v. 4 p. 647–651.
Goldmann, W. H., 2002. Mechanical aspects of cell shape regulation and signaling. *Cell Biol. Int.* v. 26 p. 313–317.
Parise, L. V., 1999. Integrin alpha(IIb)beta(3) signaling in platelet adhesion and aggregation. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 11 p. 597–601.
Schaller, M. D., 2001. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1540 p. 1–21.
Shattil, S. J., 1999. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb. Haemost.* v. 82 p. 318–325.
Stewart, M., and Hogg, N., 1996. Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. avidity. *J. Cell Biochem.* v. 61 p. 554–561.

研究

Bleijs, D. A., van Duijnhoven, G. C., van Vliet, S. J., Thijssen, J. P., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y., 2001. A single amino acid in the cytoplasmic domain of the beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 regulates avidity-dependent inside-out signaling. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 10338–10346.

Vinogradova, O., Haas, T., Plow, E. F., and Qin, J., 2000. A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 1450–1455.

15.15 整联蛋白和细胞外基质在发育过程中扮演重要角色

综述

Brown, N. H., 2000. Cell-cell adhesion via the ECM: Integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol.* v. 19 p. 191–201.

Sheppard, D., 2000. *In vitro* functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* v. 19 p. 203–209.

Tarone, G., Hirsch, E., Brancaccio, M., De Acetis, M., Barberis, L., Balzac, F., Retta, S. F., Botta, C., Altruda, F., Silengo, L., and Retta, F., 2000. Integrin function and regulation in development. *Int. J. Dev. Biol.* v. 44 p. 725–731.

研究

Brakebusch, C., Grose, R., Quondamatteo, F., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Pirro, A., Svensson, M., Herken, R., Sasaki, T., Timpl, R., Werner, S., and Fassler, R., 2000. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *EMBO J.* v. 19 p. 3990–4003.

Potocnik, A. J., Brakebusch, C., and Fassler, R., 2000. Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* v. 12 p. 653–663.

Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M., and Edgar, D., 1999. Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J. Cell Biol.* v. 144 p. 151–160.

15.16 紧密连接形成了细胞间的选择性渗透屏障

综述

Anderson, J. M., Van Itallie, C. M., and Fanning, A. S., 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 140–145.

Anderson, J. M., and Van Itallie, C. M., 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* v. 269 p. G467–G475.

Cereijido, M., Valdes, J., Shoshani, L., and Contreras, R. G., 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Ann. Rev. Physiol.* v. 60 p. 161–177.

Citi, S., and Cordenonsi, M., 1998. Tight junction proteins. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1448 p. 1–11.

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A., 2000. MAGUK proteins: Structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 315–324.

Zahraoui, A., Louvard, D., and Galli, T., 2000. Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J. Cell Biol.* v. 151 p. F31–F36.

15.17 无脊椎动物的分隔连接类似于紧密连接

综述

Woods, D. F. and Bryant, P. J., 1994. Tumor suppressor genes and signal transduction in *Drosophila*. *Princess Takamatsu Symp* v. 24 p. 1–13.

Wu, V. M., and Beitel, G. J., 2004. A junctional problem of apical proportions: Epithelial tube-size control by septate junctions in the Drosophila tracheal system. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 493–499.

研究

Bilder, D., Li, M., and Perrimon, N., 2000. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* v. 289 p. 113–116.

Bilder, D., Schober, M., and Perrimon, N., 2003. Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat. Cell Biol.* v. 5 p. 53–58.

Bilder, D. and Perrimon, N., 2000. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* v. 403 p. 676–680.

Garavito, R. M., Carlemalm, E., Colliex, C., and Villiger, W., 1982. Septate junction ultrastructure as visualized in unstained and stained preparations. *J. Ultrastruct. Res.* v. 80 p. 344–353.

15.18 粘连连接将相邻细胞连接在一起

综述

Tepass, U., 2002. Adherens junctions: New insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* v. 24 p. 690–695.

Vleminckx, K., and Kemler, R., 1999. Cadherins and tissue formation: Integrating adhesion and signaling. *Bioessays* v. 21 p. 211–220.

Yap, A. S., Brieher, W. M., and Gumbiner, B. M., 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 119–146.

研究

Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M., 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* v. 54 p. 993–1001.

Sivasankar, S., Brieher, W., Lavrik, N., Gumbiner, B., and Leckband, D., 1999. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 96 p. 11820–11824.

15.19 桥粒是基于中间纤维的细胞粘连复合体

综述

Getsios, S., Huen, A. C., and Green, K. J., 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 271–281.

Irvine, A. D., and McLean, W. H., 2003. The molecular genetics of the genodermatoses: Progress to date and future directions. *Br. J. Dermatol.* v. 148 p. 1–13.

McMillan, J. R., and Shimizu, H., 2001. Desmosomes: Structure and function in normal and diseased epidermis. *J. Dermatol.* v. 28 p. 291–298.

Trent, J. F., and Kirsner, R. S., 1998. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent. *Int. J. Clin. Pract.* v. 52 p. 408–413.

研究

North, A. J., Bardsley, W. G., Hyam, J., Bornslaeger, E. A., Cordingley, H. C., Trinnaman, B., Hatzfeld, M., Green, K. J., Magee, A. I., and Garrod, D. R., 1999. Molecular map of the desmosomal plaque. *J. Cell Sci.* v. 112 (Pt 23) p. 4325–4336.

15.20 半桥粒连接上皮细胞和基底膜

综述

Nievers, M. G., Schaapveld, R. Q., and Sonnenberg, A., 1999. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* v. 18 p. 5–17.

Pulkkinen, L., and Uitto, J., 1998. Hemidesmosomal variants of epidermolysis bullosa. Mutations in the alpha6beta4 integrin and the 180-kD bullous pemphigoid antigen/type XVII collagen genes. *Exp. Dermatol.* v. 7 p. 46–64.

研究

Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Elwell, J., and Stepp, M. A., 1993. Redistribution of the hemidesmosome components alpha 6 beta 4 integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp. Cell Res.* v. 207 p. 86–98.

15.21 间隙连接允许相邻细胞间分子的直接传输

综述

Evans, W. H., and Martin, P. E., 2002. Gap junctions: Structure and function. *Mol. Membr. Biol.* v. 19 p. 121–136.

Levin, M., 2002. Isolation and community: A review of the role of gap-junctional communication in embryonic patterning. *J. Membr. Biol.* v. 185 p. 177–192.

Saffitz, J. E., Laing, J. G., and Yamada, K. A., 2000. Connexin expression and turnover: Implications for cardiac excitability. *Circ. Res.* v. 86 p. 723–728.

Stout, C., Goodenough, D. A., and Paul, D. L., 2004. Connexins: Functions without junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 507–512.

Yeager, M., and Nicholson, B. J., 1996. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 6 p. 183–192.

研究

Castro, C., Gomez-Hernandez, J. M., Silander, K., and Barrio, L. C., 1999. Altered formation of hemichannels and gap junction channels caused by C-terminal connexin-32 mutations. *J. Neurosci.* v. 19 p. 3752–3760.

Haubrich, S., Schwarz, H. J., Bukauskas, F., Lichtenberg-Fraté, H., Traub, O., Weingart, R., and Willecke, K., 1996. Incompatibility of connexin 40 and 43 Hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. *Mol. Biol. Cell* v. 7 p. 1995–2006.

Imanaga, I., Kameyama, M., and Irisawa, H., 1987. Cell-to-cell diffusion of fluorescent dyes in paired ventricular cells. *Am. J. Physiol.* v. 252 p. H223–H232.

Safranyos, R. G., Caveney, S., Miller, J. G., and Petersen, N. O., 1987. Relative roles of gap junction channels and cytoplasm in cell-to-cell diffusion of fluorescent tracers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 84 p. 2272–2276.

15.22 钙依赖的钙黏蛋白介导细胞间的粘连

综述

Angst, B. D., Marcozzi, C., and Magee, A. I., 2001. The cadherin superfamily: Diversity in form and function. *J. Cell Sci.* v. 114 p. 629–641.

Fleming, T. P., Sheth, B., and Fesenko, I., 2001. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front. Biosci.* v. 6 p. D1000–D1007.

Gottardi, C. J., and Gumbiner, B. M., 2001. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr. Biol.* v. 11 p. R792–R794.

Yap, A. S., Brieher, W. M., and Gumbiner, B. M., 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev.*

Cell Dev. Biol. v. 13 p. 119–146.

研究

Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R., 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 91 p. 8263–8267.

Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., Matsuyoshi, N., and Takeichi, M., 1995. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J. Cell Biol.* v. 128 p. 949–957.

Yap, A. S., Brieher, W. M., Pruschy, M., and Gumbiner, B. M., 1997. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: A fundamental determinant of cadherin function. *Curr. Biol.* v. 7 p. 308–315.

15.23 钙依赖的NCAM介导神经细胞间的粘连

综述

Cremer, H., Chazal, G., Lledo, P. M., Rougon, C., Montaron, M. F., Mayo, W., Le Moal, M., and Abrous, D. N., 2000. PSA-NCAM: An important regulator of hippocampal plasticity. *Int. J. Dev. Neurosci.* v. 18 p. 213–220.

Ronn, L. C., Hartz, B. P., and Bock, E., 1998. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp. Gerontol.* v. 33 p. 853–864.

研究

Barthels, D., Vopper, G., Boned, A., Cremer, H., and Wille, W., 1992. High degree of NCAM diversity generated by alternative RNA splicing in brain and muscle. *Eur. J. Neurosci.* v. 4 p. 327–337.

Becker, C. G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H., and Schachner, M., 1996. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* v. 45 p. 143–152.

Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., and Represa, A., 1997. NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* v. 8 p. 323–335.

Edelman, G. M., and Chuong, C. M., 1982. Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 79 p. 7036–7040.

Krog, L., Olsen, M., Dalseg, A. M., Roth, J., and Bock, E., 1992. Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma. *J. Neurochem.* v. 59 p. 838–847.

Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., and Schachner, M., 2002. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.* v. 157 p. 521–532.

Phillips, G. R., Krushel, L. A., and Crossin, K. L., 1997. Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res. Dev. Brain Res.* v. 102 p. 143–155.

Sato, K., Hayashi, T., Sasaki, C., Iwai, M., Li, F., Manabe, Y., Seki, T., and Abe, K., 2001. Temporal and spatial differences of PSA-NCAM expression between young-adult and aged rats in normal and ischemic brains. *Brain Res.* v. 922 p. 135–139.

Seki, T., 2002. Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J. Neurosci. Res.* v. 69 p. 772–783.

Vimr, E. R., McCoy, R. D., Vollger, H. F., Wilkison, N. C., and Troy, F. A., 1984. Use of prokaryotic-derived probes to identify poly(sialic acid) in neonatal neuronal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 1971–1975.

15.24 选择蛋白控制循环免疫细胞的粘连

综述

Patel, K. D., Cuvelier, S. L., and Wiehler, S., 2002. Selectins: Critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin. Immunol.* v. 14 p. 73–81.

Renkonen, R., 1998. Endothelial sialyl Lewis x as a crucial glycan decoration on L-selectin ligands. *Adv. Exp. Med. Biol.* v. 435 p. 63–73.

Smith, C. W., 2000. Possible steps involved in the transition to stationary adhesion of rolling neutrophils: a brief review. *Microcirculation* v. 7 p. 385–394.

Zak, I., Lewandowska, E., and Gnyp, W., 2000. Selectin glycoprotein ligands. *Acta. Biochim. Pol.* v. 47 p. 393–412.

桑建利　译

第 7 篇　原核及植物细胞



第16章　原核细胞生物学

Jeff Errington

Institute for Cell and Molecular Biosciences，University of Newcastle upon Tyne，Newcastle upon Tyne，United Kingdom

Matthew Chapman

Department of Molecular，Cellular and Developmental Biology，University of Michigan，Ann Arbor，MI

Scott J. Hultgren 和 Michael Caparon

Department of Molecular Microbiology，Washington University School of Medicine，St. Louis，Mo

本章概要

16.1 导言

关键概念

- 与真核细胞相比，原核细胞的结构相对简单，但却体现出很高的经济性、精细的结构及复杂性。
- 在细胞生物学中描述了部分原核生物，相对于巨大丰富多样性的原核生物，这只是一些代表。
- 原核细胞中的许多重要结构是非常保守的。
- 由于一些原核生物的结构和生命过程在很大范围内是可选择的，是其拥有多样性和适应性的原因，使它们能在特殊环境，甚至非常残酷的环境中生存。
- 原核生物基因组具有高度的“柔韧性”，其中的一些机制使原核生物获得适应和快速的发展进化。

原核生物是没有真正细胞核的单细胞生物，而真核生物则有由膜状结构包裹DNA而形成的细胞核（见BIO：16-0001）。原核细胞与真核细胞相比还有其他区别，原核细胞结构相对简单，遗传信息少（图16.1）（真核细胞结构见图4.1）。原核细胞一般具有一条环状染色体，与结合蛋白一起组成拟核。大多数原核细胞不具有内膜系统，但有些原核生物如光合细菌具有内膜。原核细胞不再被认为是“酶袋”，现在看来，原核细胞是高度有组织的。许多蛋白质特异性地结合在亚细胞结构域中，原核细胞甚至含有与肌动蛋白和微管蛋白的同源蛋白，发挥简单的细胞骨架功能。

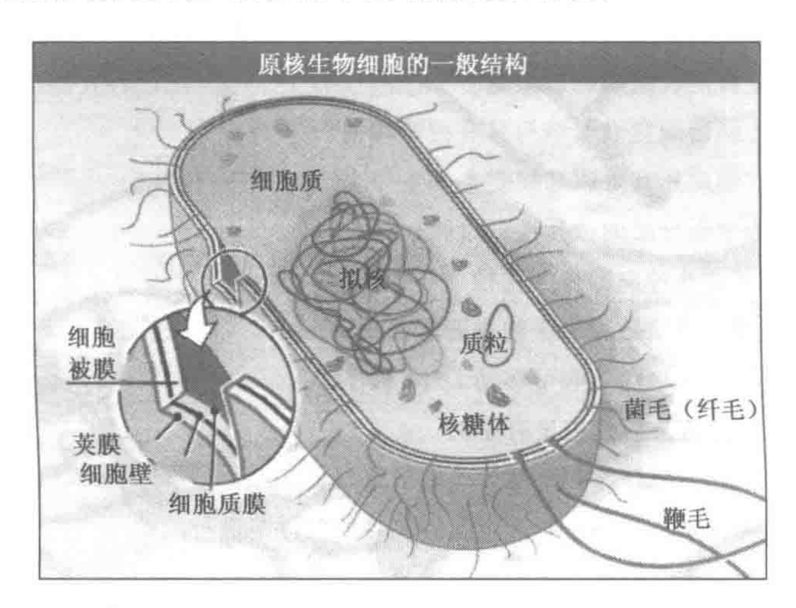


图16.1 原核细胞的特征是缺乏膜包围的细胞核。

通过本章，主要理解原核细胞的组织结构。围绕原核细胞外被的表面结构包括细胞质膜、细胞壁和荚膜。另外，革兰氏阴性菌具有外膜，这些细菌趋向于具有很薄的细胞壁，在革兰氏染色过程中，这层结构不结合结晶紫（见图16.2）。与之相比，革兰氏阳性菌具有厚的细胞壁，不具外膜。在后面的内容中，我们将详细讨论细胞质膜表面结构的不同组成（见16.5 大多数原核生物产生一个富含多糖的结构层，称之为荚膜；16.6 细菌细胞壁含网状结构的肽聚糖；16.7 革兰氏阳性细菌细胞表面具有独特特征；16.8

革兰氏阴性细菌具有外膜和周质空间；16.9 细胞质膜是细胞分泌的选择性透过膜）。

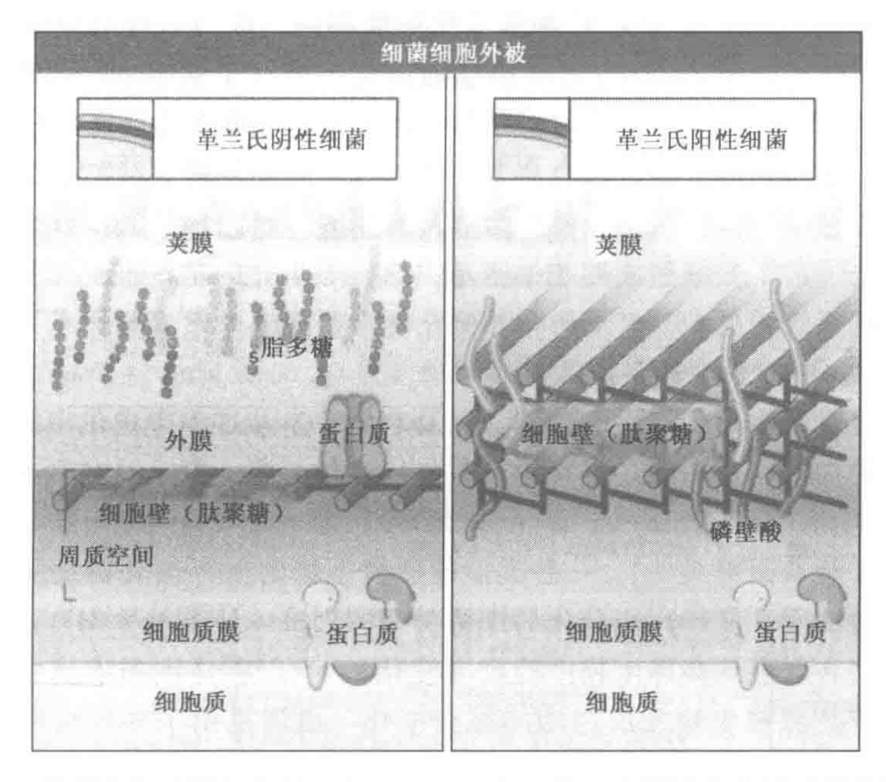


图 16.2 根据革兰氏染色结果可将细菌细胞分为革兰氏阴性和革兰氏阳性两个类群。与革兰氏阳性细菌相比，革兰氏阴性细菌不结合结晶紫、具有外膜和薄的细胞壁。

关于原核细胞的结构和功能的详细信息主要通过几种易于研究的模式种类体现出来。但是，原核生物在进化上是古老和多样性的类群，如图 16.3 所示。理解原核生物系统发育具有很大困难，因为原核生物是无性繁殖生物，常用于描述高等生物的概念在原核生物中不能应用。另外，原核生物在一定范围内，其基因具有转移和传递的能力（两个没有亲缘关系的原核生物间也可以传递遗传物质）。这种基因转移使试图利用单一标准对原核生物进行的分类变得很混淆。分子方法，特别是 rRNA 序列及最近完成的全部基因组序列，可以从域（domain）的水平对原核生物加以描述，促进了原核生物系统发育学和系统学研究。原核生物可以分为两大类，细菌和古菌，将在后面加以讨论（见 16.2 应用分子系统发育学技术研究微生物进化）。

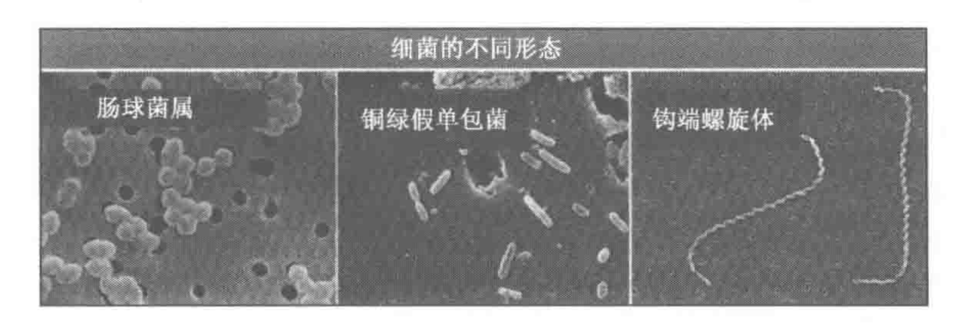


图 16.3 细菌的 3 种主要不同的形态是球菌、杆菌和螺旋菌。图片由 Janice Carr/NCID/HIP/CDC 惠赠。

从细胞生物学角度，原核生物主要集中在手头几个易于操作的生物，并在医学上

或工业应用上都具有实际意义。这些知识主要来自两种细菌：大肠杆菌和枯草芽孢杆菌，分别是革兰氏阴性细菌（G^-）和革兰氏阳性细菌（G^+），这两类细菌的祖先可能在二十亿年前“分道扬镳”，各自进行独立的进化。但对于众多的原核生物类型来说，大肠杆菌和枯草芽孢杆菌只是“冰山一角”。本章虽然大部分内容集中在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌及与之相近的种类，但也会分析和讨论与之不同的生物的多样性。

大肠杆菌和枯草芽孢杆菌已经被作为非常有用的工具来理解其所代表的生物类群的一般特点，已经了解了如细胞周期和细胞基本结构等生命的基本过程和系统，本章中的几节将讨论这些系统，见 16.15 *原核细胞染色体分离是在缺乏有丝分裂器的条件下进行的*；16.16 *原核细胞分裂涉及形成复杂的细胞动力环*（cytokinetic ring）。但对原核细胞最大的兴趣来自对其生命多样性的理解，以及它们在生命过程中进化出的一些与特殊小生境相适应的附加结构及功能。本章的几节将描述如荚膜、鞭毛及它们不同的适应功能（见 16.5 *大多数原核生物产生一个富含多糖的结构层，称之为荚膜*；16.11 *菌毛和鞭毛是大多数原核生物表面附属物*）。一些类群的原核生物的生存与其在发展变化中的适应能力有关，有时涉及高度特化和分化的细胞类型的形成，使原核生物有进化发展为高等生物的可能（使人联想到高等生物中的发展变化）。我们将详细描述这些发展变化，这些发展变化也许是原核生物发展周期的部分变化，也许是由于外界刺激所引起的（见 16.17 *原核细胞通过复杂的机制对刺激发生反应*；16.18 *一些原核生物生命周期的发育改变是必然的*）。最后，原核生物对人类的作用，有些是病原菌，有些与人类共生，有些是重要的工业发酵菌种，也有些在环境中具有广泛应用。本章的几节将描述这些相互作用的细胞生物学（见 16.19 *一些原核细胞和真核细胞具有内共生联系*；16.20 *原核生物可在高等生物上生存并引起疾病*；16.21 *生物膜是高度有组织的生物群落*）。

16.2 应用分子系统发育学技术研究微生物进化

关键概念

- 地球上的原核生物种类只有部分被分析。
- 独特的分类学技术被应用到原核生物分类中。
- 核糖体 RNA（rRNA）比较研究建立了“三域进化树”，包括细菌、古菌和真核生物。

研究原核生物的进化就是要确定微生物精确的亲缘关系。原核生物分类面临着许多问题，如形态学方法、遗传特征或化石记录，这些方法都不实际，况且我们现在对地球上巨大的微生物种类理解很少或根本不理解。几种方法被用于原核生物分类，这些方法包括数值分类（如是否存在荚膜层、不同的革兰氏染色反应、氧气的需求、核酸需要的特征、能否形成芽孢、是否具有运动性、是否存在一些某些特定的酶等）基于许多特征的比较，来比较研究微生物之间的相似性或不同。但数值分类要求被分类微生物的大量知识，对于不可培养微生物及研究较少的微生物不太适合。

对于研究相对较少的微生物，可以通过分子系统发育技术进行分类。分子分类技术是基于不同微生物之间遗传物质的差异进行的。有几种使用 DNA 进行分类的技术，可以根据染色体 DNA 碱基含量不同进行分群。DNA 含有 4 种碱基：腺嘌呤 A、胸腺嘧啶 T、胞嘧啶 C 和鸟嘌呤 G，并且是相互配对的。所以 A 与 T 相等，G 与 C 相等。染色体 DNA 的 G+C 百分比（G-C 含量）介于 45%～75%。对于亲缘关系较近的微生物

的 G-G 含量是相似的。但是 G-C 含量相似并不意味着亲缘关系较近。如枯草芽孢杆菌和人类具有极为相近的 G-C 比，但不具进化上的亲缘关系。在许多情况下，G-C 含量测定是非常容易操作的方法，被用于对生物进化上相似性关系的初步判断。

有争论的是：大多数精确的和强大的分子系统发育学方法是比较高度保守的基因序列。两种生物核糖体小亚基 RNA（SSUrRNA）序列相似程度可表明彼此之间的进化相似程度。由于 SSUrRNA 基因的普遍性和进化的稳定性，它们对于进化分析是非常理想的。通过分离 rRNA 基因，并直接测定序列，或者是通过 PCR 扩增其 DNA 并克隆。后者对于研究一些含量很少的种类或不容易培养的种类的特征是非常有用的。得到一个序列信息后，可通过计算机程序对 rRNA 序列进行分析比较，绘制系统发育树（见图 16.4）。

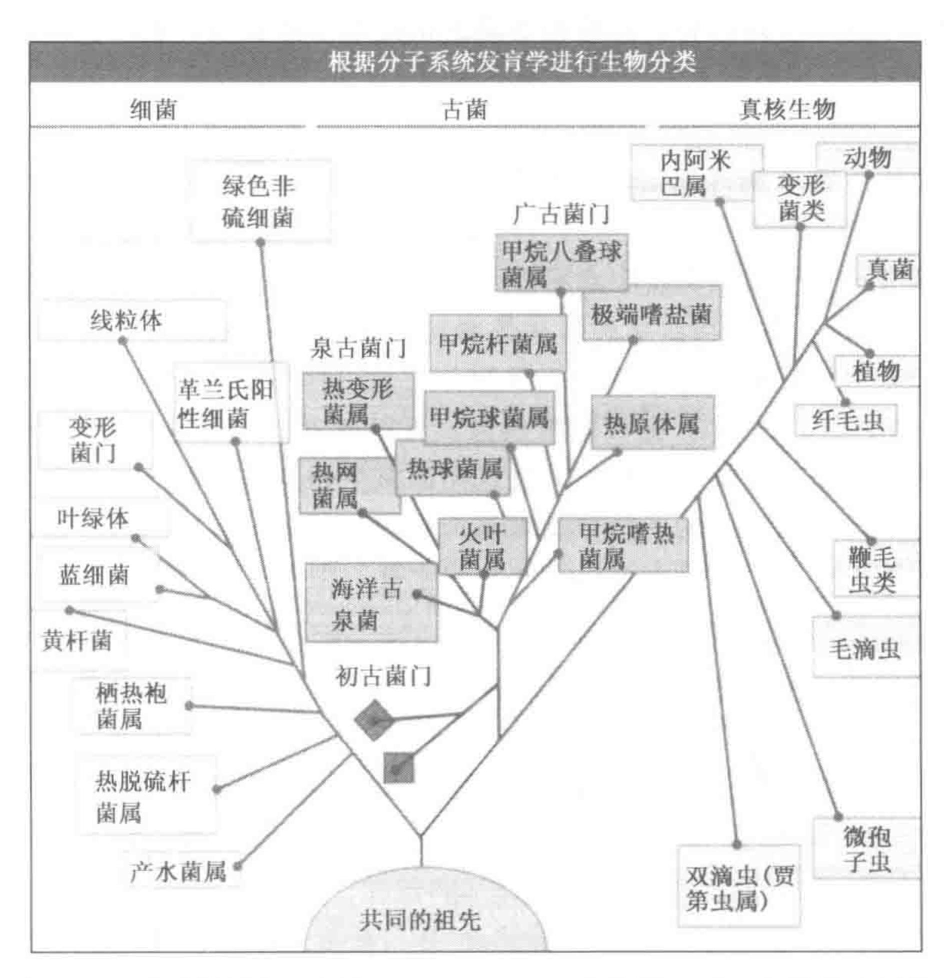


图 16.4　根据核糖体小亚基序列绘制的系统发育树显示生物类群之间的相互关系。

序列比较已经揭示出关于原核生物系统发育学关系方面的一些令人惊奇的结果。应用传统的表型分类方法，包括数值分类法，生物学家将地球上的生物分为五界，其中只有一界是原核生物（见BIO：16-0002）。与之相比，分子系统学发育揭示出具有细胞结构的生物已进化为三个主要分支域，其中的两个是原核生物。细菌和古菌构成了两个原核生物域，另外一个单纯的真核分支称之为真核域（见图 16.4）。有趣的是，古菌 rRNA 与真核生物 rRNA 十分相似，这要超过细菌 rRNA 与古菌 rRNA 的相似程度。在分类命名中，虽然仍将细菌和古菌称为原核生物，但过去经常称细菌域为真细菌域（Eubacteria），过去称

古菌域为古细菌域（Archaebacteria），现在分别称细菌域和古菌域。

分子系统发育学的先驱 Carl Woese 及其同事应用 rRNA 序列将生物进化历史用进化树进行描述。位于这个树的基部的是单细胞祖先，可能是地球上所有生物的共同祖先，现在已经在这三域中发现许多共同的基因，说明在生物进化的早期，基因的水平传递是很普遍的。所以假设编码细胞核心功能的基因，如转录和翻译等的基因从原始种类在种群间进行自由的传递。这一假说可以解释细胞不管是处在哪个分支都具有许多共同的基因。由于每个分支（lineage）继续发育和进化，一些特定的生物学特征被丢失，而另一些被获得，使每个分支拥有自己一套独特的遗传物质。在进化树上，细菌域至少被分成 10 个主要的分支（见图 16.4）。但这个数量可能是比较低的，因为微生物可分为可培养和不可培养微生物。只有极少部分微生物在实验室条件下生长。一些细菌分支，通过系统发育学进行比较区分，这些种类缺乏比较明显的表型一致。如变形菌纲（Proteobacteria）包含的种类具有混合的生理学特性，它的宽度范围几乎包括所有已知的原核生物。

第二个原核生物域是古菌，古菌包含三个主要分支：泉古菌门（Crenarchaeota），广古菌门（Eurychaeore）和初古菌门（Korarchaeola）。从生理学的角度，细菌和古菌是非常容易区分的，细菌细胞壁中含有肽聚糖，而古菌细胞壁中不含肽聚糖（肽聚糖的细节见 16.6 **细菌细胞壁含网状结构的肽聚糖**）。真核域（Eukarya）成员的细胞壁中也缺乏肽聚糖。非常接近古菌进化树的基部的分支是甲烷嗜热菌属（*Methanopyrus*），甲烷嗜热菌属（*Methanopyrus*）是极端嗜热菌，可以在 110℃以上的温度生长存在。这类生物可以追溯到地球早期极端环境，并且这类原核生物（或类似这类古菌）可能代表地球早期的生命形式。古菌中的一些分支被认为起源于环境样品核糖体基因的，这些样品来自外来的环境如外海、南极海水以及深海热水孔，但是这类样品也可以在通常的土壤和湖水样品中检测到。

现在的观点是，关于生命系统发育树在被不断改进。面临的困难是怎样应用当前的系统发育学将生物分类到种的水平。从另一个角度看，怎样将一群物种划分到一个分支或一个域中。由于新的种类不断被发现，分类学上的主要分支可能会被重新考虑或重建。

16.3 原核生物生命类型的多样性

关键概念

- 由于许多原核生物是不可培养微生物，阻碍了我们对进化过程中原核生物多样性的理解。
- DNA 样品被用来研究来自不同生态环境的微生物的多样性。
- 根据原核生物在环境中生存和复制的能力，原核生物具有不同的特征，这类环境的差异幅度很大，如温度、pH、渗透压、氧的浓度等。

我们关于原核生物的了解来自实验室中能培养或不可培养的微生物。初步估计环境中 99%以上的原核生物用目前的技术是不可培养的。这就存在一个问题，因为关于大多数原核生物的知识主要来自实验室可培养的微生物。除了这点以外，DNA 样品可用来进行较好的研究，原核生物有惊人的多样性，生存在不同的环境中。它们可以生存在人体中、池塘中、湖泊中、河流中、深海孔中、海洋底部、热泉中（温度可达 100℃以

上）。同等重要的是许多不同的营养成分可被原核生物利用，维持其生命活动。原核生物的生长可受许多因素影响，包括 pH、温度、氧气、水、渗透压等。在这些不同的物理因素中，营养成分的供应如 C、N、S、P 以及许多维生素和微量元素等都可以影响其生长。我们将讨论原核微生物生长的主要限制因素，同时列举生活在这些环境中的一些例子。图 16.5 根据生长条件对微生物的分类进行了总结。

原核生物生活方式的多样性	
原核生物类型	最适生长条件
嗜冷菌	～0－20℃
嗜温菌	～25－40℃
嗜热菌	～50－110℃
嗜酸菌	pH<5.4
嗜中性菌	pH～5.4－8.0
嗜碱菌	pH>8.0
专性需氧菌	需要
微需氧菌	低浓度　高浓度
耐氧菌	不需要氧，但不受氧毒害
专性厌氧菌	如有氧气存在不能存活
兼性厌氧菌	有氧呼吸或发酵
嗜压菌	高静水压

图 16.5　根据原核生物生长条件进行分类。

根据在不同温度下的生长能力，可将原核生物划分为三个主要类群：嗜冷菌、中温菌、嗜热菌。嗜冷菌是低温微生物，可以在 15～20℃温度范围很好地生长，其中的一些种类还可在 0℃生长较好。*Bacillus globisporus* 是严格的嗜冷菌，不能在高于 20℃的温度中生长。嗜冷菌不能在人体中生长，因为人体温度相对较高，可生活在冷环境的水中和土壤中。分离自嗜冷菌的酶可以在低温范围很好地工作。生物技术工业将利用嗜冷菌中的酶，如来自嗜冷菌的蛋白酶可以用于洗涤剂中，在室温条件下具有较高的活性。“减冰”嗜冷菌可以用于进行人工生物抗冻，保护作物不被冰冻。

大多数已知的原核生物是中温菌，在 25～40℃之间生长较好。这类微生物被广泛研究，因为这类微生物包括几乎所有人类病原菌。其中的一些生物可以忍受短时间的高温，经受巴斯德消毒，在罐头食品制造中具有潜在的危害。嗜热菌是嗜热微生物，一般生长在 50～60℃温度范围，但其中的一些能忍受高达 110℃的高温。古菌中的硫叶菌属（*Sulfolobus*）常常在地球热泉中发现（见图 16.6），在 80～85℃生长最好。这种类型的微生物被称作超嗜热菌，从这类菌的细胞中提取的酶可应用在许多领域。最熟悉的是从水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）中分离的 *Taq*DNA 聚合酶，被应用在聚合酶链反应中（PCR）。从嗜热菌中分离出的这个酶在较高温度条件下具有稳定性，在 PCR 反应中高温 DNA 变性温度和低温退火中仍然保持活性。

还可根据微生物生长在酸性和碱性环境中的能力对原核生物进行分类。与温度情况很类似，许多微生物可忍受不同 pH 范围，使其占据这个小生境，但这个环境对于其

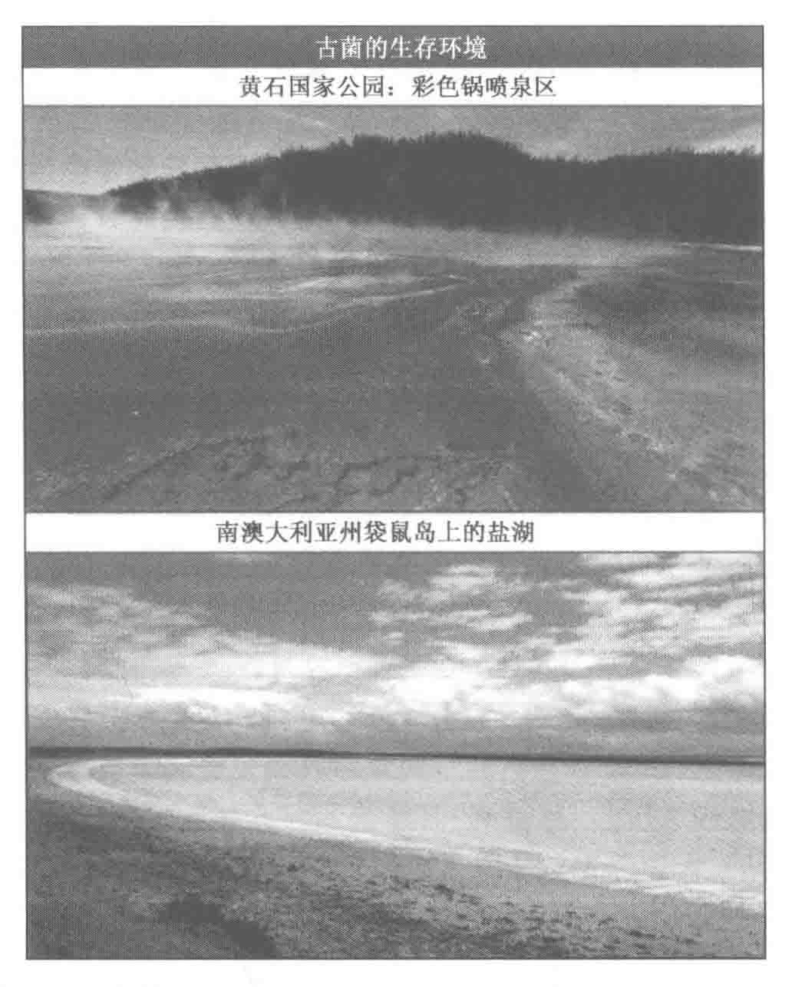


图 16.6 古菌的两个环境。照片由黄石国家公园的 J. Schmidt（上）和 Melbourne 大学的 Mike Dyall-Smith（下）惠赠。

他微生物是不适应的，嗜酸菌是嗜酸微生物，在 pH 低于 5.4 时生长最好。这类微生物常常产生酸作为发酵的副产物。乳酸杆菌（*Lactobacillus*）发酵葡萄糖产生乳酸，降低局部环境 pH，从而抑制非嗜酸微生物的生长。嗜中性 pH 菌，包括大多数人体病原菌，最适 pH 为 5.5～8.0。嗜碱菌喜欢生活在碱性环境中，这类微生物生活在 8.0 以上的 pH 环境中。一些土壤中的嗜碱的原核微生物种类可以生活在 pH12 的环境中。人类病原菌副溶血性弧菌（*Vibrio chalerae*）在 pH9.0 的环境生长。大多数情况下，能忍受 pH 的微生物是由于细胞壁的保护的结果。虽然微生物在某 pH 环境具有最佳生长，但在大多数情况下，细胞内环境 pH 仍然保持在 7.0，偏离中性 pH 环境会导致蛋白质变性，同时还可干扰跨膜质子梯度。细胞内环境的 pH 通过细胞质膜上的离子转运蛋白进行维持（见 16.9 细胞质膜是细胞分泌的选择性透过膜）。

氧气是呼吸过程中有效的电子受体。但是并不是所有微生物都需要氧气进行呼吸，有些原核生物不进行呼吸，通过发酵产生能量。原核生物对氧的需求差异很大，通过这一点也可对微生物进行分类。严格好氧菌必须在有氧情况下才能生长。一些严格好氧的假单胞菌经常造成医院获得性感染。微好氧菌在低氧水平和高 CO_2 水平才能生长。有些原核生物可以生活在有氧的环境中，但它们的代谢过程却不需要氧，这类微生物属于耐氧菌。如 *Lactobacillus* 在有氧环境仍然进行发酵。厌氧菌是一些只能生长在没有自由氧的环境的微生物，如 *Bacteroids*。兼性厌氧菌在有氧环境呼吸，但在缺乏末端电子

受体的情况下进行发酵。生活在人类肠道低氧环境中的原核生物通常都是兼性厌氧菌，这些微生物包括大肠杆菌，具有复杂的酶系统、从而导致多样性的能量产生方式。

所有原核生物生长都需要一定的温度。然而微生物在水中生长必须忍受流水静压和有限的营养物质。一个典型的 50m 深的湖中的流水静压是空气静压的 32 倍，足够使一些种类的微生物不能适应。嗜压微生物是一类发现于海洋中深度超过 7000m 以上的原核生物。在这种深度处的静水压足以使其他生物变成生物污泥。毫无疑问，嗜压微生物不能在空气压力环境生存，因为它们的细胞壁只能在高压下才能正常地发挥功能。

另一个影响原核生物生长的因素是渗透压。渗透压导致细胞内部可溶性物质的浓度出现相对差异。如果把原核生物放到高浓度可溶性物质环境中，水分将会从细胞质流失到细胞外，细胞将发生质壁分离。相反的，如果将微生物放在低渗环境，细胞将因为从环境吸水并膨胀。在这一调节过程中发挥主要功能的是细胞质膜。

16.4 古菌属原核生物，但却与真核生物类似

关键概念

- 古菌趋向于适应极端环境，并且利用“不寻常”的能量来源。
- 古菌缺乏肽聚糖细胞壁，但具有独特的细胞表面成分。
- 古菌在主要代谢过程方面和某些结构方面如鞭毛等类似细菌。
- 古菌在 DNA 复制、转录和翻译等过程类似真核生物，但基因调控涉及细菌类调控蛋白。

原核生物可以分为两大类，现在一般称为细菌和古菌（见 16.2 应用分子系统发育学技术研究微生物进化）。两者最主要的区别是根据它们的 rRNA 序列区分的，但也反映在它们的重要的生理和生化特性上。两者的主要特征概括在图 16.7 中。古菌在一些特性方面与真核生物有惊人的共同点，更重要的是，虽然古菌由于缺乏核膜而被划分到原核生物中，但在基本的特性方面特别是细胞壁中缺乏肽聚糖与细菌有明显区别，另一方面，在古菌细胞壁中存在以醚键结合脂类的甘油，总地来说，对于古菌的了解相对细菌来说是很少的。

大多数最著名的古菌种类具有这样的特征：代谢的多样性及能在极端环境生存的能力。有些种类能生存在非常高的温度（>80℃）下。明显的，只有一个单一的蛋白，反向旋转酶（reverse gyrase），特异地发现于超嗜热古菌中，所以这一关键因子在 DNA 角度上使 DNA 保持超螺旋，对于嗜热菌适应高温具有重要意义。许多古菌的种类是特异地适应极端的 pH（嗜酸菌和嗜碱菌）或是盐（嗜盐菌）。代谢上最特殊的是产甲烷菌（如 *Methanococcus janaschii*）厌氧利用 CO_2 和甲基化合物或乙酸基；嗜热的硫还原菌（如 *Archaeglobus fulgidis*）用氧化态硫作为末端电子受体；嗜热菌（如 *Halobacterium salinarum*）能适应极端的高温环境；Crenarchaeotes（如 *Sulfolobus solfataricus*）代表古菌位于进化树基部的高度特殊的类群。这个类群中最具特征的是嗜热硫细菌。古菌系统发育树主要类群见图 16.4（原核生物多样性的细节见 16.3 原核生物生命类型的多样性）。

许多古菌的基因组已经被测序。像细菌染色体一样，古菌染色体趋向于环状并且相对紧凑，大小范围在 1.5～3Mbp。通过基因测序，可推导出全部蛋白质序列，通过这些蛋白质的序列，可预测古菌结构和功能。一般来说，古菌和细菌在细胞结构和染色

古菌拥有细菌和真核生物的双重特征			
	细菌	古菌	真核生物
细胞结构			
鞭毛	鞭毛纤丝		基于微管
核膜	无		有
细胞分裂	FtsZ 环		肌动球蛋白
核酸			
染色体	许多质粒，通常单个环状		多个，线形
mRNA 加工			mRNA 剪接，聚腺苷磷酸化，加帽
基因组织	操纵子　单顺反子		
DNA 包装	类组蛋白蛋白	核小体	
DNA 复制起始位点	Dna A/Ori C	起点识别复合体/PCMA	
RNA 多聚核心酶	简单	复杂	
转录起始识别	σ 因子	TATA 结合蛋白	
蛋白质合成			
核糖体	70S		80S
翻译起始	N-甲酰甲硫氨酸		
	SD 序列		
		5′AUG	
* 不包括泉古菌门			

图 16.7　古菌有些特征与细菌相似，有些特征与真核生物相似。

体组织形式上最为接近。古菌和细菌具有许多相似的膜结构和细胞外被成分，如 ABC 转运子和荚膜多糖。古菌和细菌在中心代谢途径方面也相似，在一些特定的适应功能上，如基于鞭毛的运动和趋化性（见 16.11 菌毛和鞭毛是大多数原核生物表面附属物）。另外，古菌基因组在插入序列和染色体外遗传因子如质粒方面也与细菌相似。

古菌的另外一些系统既与细菌也与真核细胞组织方式相似。蛋白质分泌系统和蛋白质伴侣系统就属于这个范畴。大多数核糖体亚基结构是保守的，但是古菌具有的一些亚基出现在真核生物而不是细菌。古菌翻译起始和延长因子同样与真核生物对应因子相似。但也有一些古菌的起始因子更类似于细菌。在细菌（线粒体、叶绿体）起始密码前有“核糖体结合位点”序列（SD 序列），允许基因以操纵子的形式存在。在单一 mRNA上超过一个起始位点（见 MBIO：16-0001）。在真核细胞质中依据跟踪机制（tracking mechanism）识别翻译起始位点，即选择紧临 mRNA 的 5′端的 AUG（见 MBIO：16-0002）。这种机制防止每个 mRNA 上超过一个基因被翻译。在古菌中大多数转录子是单顺反子，翻译的起始与真核生物相似，但古菌仍然具有操纵子，“下游”基因之前是细菌核糖体结合位点序列。

在 DNA 组织形式上，大多数古菌含有容易识别的与真核核心组蛋白同源的序列。包括由类似核的结构组成的染色体，这一结构在细菌没有被发现（见 16.13 细菌拟核和细胞质膜是高度有序的）。泉古菌门（Crenarchaeota）是个例外，既不含组蛋白，又不

含细菌的“类组蛋白”。在古菌DNA复制过程中，起催化作用的是DNA聚合酶，与真核生物的DNA聚合酶相似。同样的是，DNA复制的一些起始因子及DNA聚合酶催化过程也类似真核生物而不同于细菌。

古菌的转录机制是相当复杂的。RNA聚合酶核心酶以及与转录起始有关的一些因子也与真核生物相似。RNA聚合酶的核心包含11个亚基，而大多数细菌RNA聚合酶缺乏这些亚基。转录起始的控制因子在大多数情况下与真核生物同源，其中TATA结合蛋白（TBP）是与识别启动子的中心因子，没有sigma因子，而sigma因子在细菌转录起始及启动子识别中发挥重要作用，当前对古菌转录所知甚少，但惊奇的是古菌基因组序列似乎含有许多转录调控子，这些与细菌是相似的。这表明在古菌中虽然RNA聚合酶本身与真核生物相似，但基因表达的激活和抑制功能与细菌相似（转录的细节见MBIO：16-0003和MBIO：16-0004）

大多数古菌含有在细胞分裂中起关键作用的蛋白FtsZ［见16.16 *原核细胞分裂涉及形成复杂的细胞动力环*（cytokinetic ring)］，但没有发现明显的细菌细胞分裂蛋白或真核分裂蛋白。更重要的是，泉古菌门（Crenarchaeota）与其他古菌有区别，缺乏FtsZ，这表明在这类古菌中的细胞分裂机制是独特的，与其他生物细胞分裂方式是有区别的。

小结：古菌在特性上可以看做是真核生物与细菌的杂合体，同时古菌具有一些独特的特征。这一杂合特性可以反映它们在进化上的位置（见图16.4），古菌基本的细胞组织结构同原核细胞相似，但一些基本的细胞水平的过程，特别是涉及遗传信息的传递等却与真核生物相似。通过研究，古菌可以揭示真核生物的进化。更重要的是，古菌遗传系统比真核生物更简单，是研究DNA复制和转录过程非常好的模型。

16.5 大多数原核生物产生一个富含多糖的结构层，称之为荚膜

关键概念

- 许多原核生物外表面含有富含多糖的一层结构，称为荚膜或黏液层。
- 推测荚膜或黏液层的功能是保护细胞防止脱水，在定居过程中与宿主细胞受体结合，防止宿主免疫系统吞噬。
- 大肠杆菌荚膜的形成通过至少四条不同途径。
- 许多原核细胞具有S层，外面的类似蛋白质的外套具有可结晶的特性。

大多数，不是全部原核细胞产生一层多糖或荚膜，分泌到细胞壁外，这种多糖-蛋白质复合体在原核生物和真核细胞中都有发现，是胞外多糖和蛋白质的复合体。对于原核细胞，不同类型的多糖蛋白质复合体是很容易区别的。多糖共价结合到细胞外部，被称为荚膜，细胞释放的松散的多糖被称为“黏液层”或“胞外多糖”。在原核生物中，荚膜的成分是不同的，但一般普遍含有多糖，包括多元醇和氨基糖、蛋白聚糖和糖蛋白。由于化学成分的不同，荚膜的厚度和可塑性也不同。荚膜多糖是通过单糖添加到长的糖链上形成的。由于任何一个单糖都可加入到另一个糖链中，所以荚膜多糖具有多样性。多糖血清型可以用于表型相似的微生物的分类，如在大肠杆菌中超过80个不同的荚膜多糖或K抗原，菌株表达一定的K抗原与特异的感染有关系。

推测荚膜层具有几种功能，包括保护细胞防止干燥、保护不被宿主细胞吞噬、防止

被去垢剂清除、防止噬菌体侵染等。保护细胞防止干燥这一点对于有荚膜的生物从一个宿主转移到另一个宿主具有重要意义。荚膜对于帮助细菌对宿主组织的黏附以及在环境表面黏附具有重要意义。荚膜同样促进与其他原核生物之间的黏附，导致生物膜的形成。如铜绿假单胞菌（*Pseudomonas Aeruginosa*）产生大量藻酸盐导致在肺里形成生物膜，这层很厚的藻酸盐层保护细菌防止抗生素及宿主防御系统的攻击（生物膜的细节见 16.21 生物膜是高度有组织的生物群落）。

除铜绿假单胞菌外，其他病原菌依靠荚膜在宿主细胞中定居和生长繁殖。如在炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）中的第一个被发现的毒力因子——荚膜，是引起炭疽病的致病因子，见图 16.8。炭疽芽孢杆菌的荚膜成分是多聚 D-谷氨酸（Polymeric D-glutamic acid），是在原核生物中发现的唯一主要由肽组成的荚膜。荚膜成分在细胞内合成，对于炭疽芽孢杆菌，如果不能合成荚膜则其致病力降低。因为炭疽芽孢杆菌的荚膜只有弱的免疫反应性，推测荚膜在宿主免疫反应时保护病原体。荚膜可抑制宿主免疫系统产生的补体蛋白的结合，从而导致病原菌在人类循环系统中继续生存。

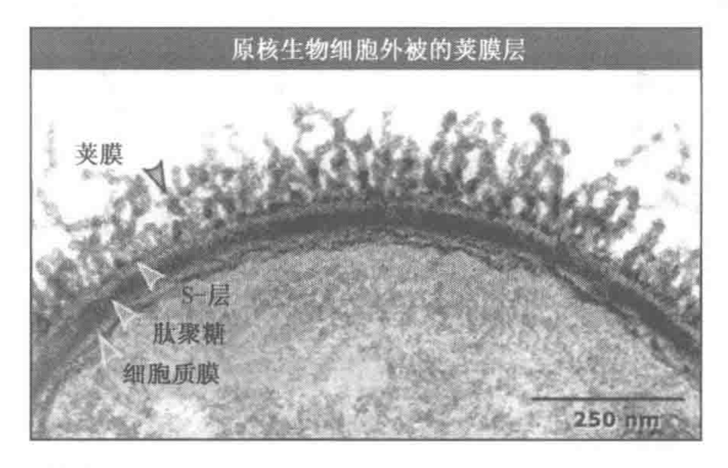


图 16.8　荚膜是大多数原核生物细胞表面的外层结构。电子显微照片显示炭疽芽孢杆菌细胞表面结构。照片及其解释来自 Mesnage，S.，Tosi-Couture，E.，Gounon，P.，Mock，M.，and Fouet，A. *J. Bacteriol.* 1998. 180：52-58. © ASM。

结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）的荚膜是其主要的毒力因子。结核分枝杆菌荚膜介导与巨噬细胞的黏附，是侵染宿主细胞的关键步骤。由于巨噬细胞能吞噬和破坏微生物，所以微生物具有不同的策略逃脱巨噬细胞。对于结核分枝杆菌，荚膜是这一过程的关键过程。首先结核分枝杆菌荚膜促进与巨噬细胞 CR3 受体的结合，触发信号途径导致“安全”入侵途径。荚膜对于排除反应氧介导的反应具有作用，在巨噬细胞中进行的氧介导的反应可以杀死病原体。这一特征帮助我们解释为什么有荚膜的结核分枝杆菌可以逃脱免疫系统的监视而仍然存在于宿主细胞内，而没有荚膜的菌株则毒力较弱。事实上，荚膜较少的菌株可以用来作为疫苗触发免疫反应，防止肺结核发生。

虽然在几种细菌中研究荚膜的生物发生，但在大肠杆菌中研究得最为深刻。根据遗传和生物发生原则，大肠杆菌的荚膜可以分为四个群，类群 1 和类群 2 的生物发生被广泛研究。在大肠杆菌中，转运类群 1 和类群 2 荚膜到细胞表面的指定位置，在这里，细胞质和外膜及荚膜相互紧密结合。Wza 是外膜中的一个脂蛋白，形成一个高分子质量

复合体。这一复合体在1类荚膜转移过程中发挥主要作用。预测Wza是一个β-桶状蛋白，Wza和Wzc一起形成了一个通道，荚膜前体就是通过这个通道分泌的。这一分泌系统在功能上和发生上与外膜上的引导员蛋白（usher protein）PapC具有联系（见16.10原核生物具有几种细胞分泌途径）。类群2荚膜则通过KpsE和KpsD蛋白穿梭跨过外膜。KpsE通过N端锚定在细胞质膜，而其大部分蛋白残基留在周质空间中。虽然KpsE不能跨越外膜，但KpsE的C端与之相连，这一分泌装置取决于细胞质和外膜的接近，虽然其确切功能目前没有解决，KpsD是一个周质空间蛋白，需要KpsE将其引导到外膜。对类群3和类群4荚膜了解很少。

作为与荚膜的类似物或附属结构，许多细菌和古菌细胞外表面结合一层蛋白质性质的结构，称为**表面层（S层）**。S层来自一个单一蛋白或糖蛋白，且可以自我组装形成晶体栅格结构。蛋白质的序列并不是特别地保守，但常常富含酸性和疏水氨基酸残基。特别是在古菌和G^+细菌中，一些蛋白被糖基化，有时在多个位点，链的长度由20～50个相似的、重复的一系列的糖亚单位组成。图16.9显示经冰冻蚀刻法处理过的样品具有六边形对称结构，同时显示了S层横切面。S层一般5～25nm厚，外表面相对光滑，内表面具有皱褶，在此处，与其里面的细胞外被层相连接。通过与细胞表面分子如磷壁酸（革兰氏阳性细菌）或脂多糖（革兰氏阴性细菌）的相互结合，S层的组装与细胞表面显得很协调（磷壁酸分子的细节见16.7革兰氏阳性细菌细胞表面结构具有独特特征；脂多糖分子的细节16.8革兰氏阴性细菌具有外膜和周质空间）。S层的组装和位置与荚膜（当两层同时存在）之间具有怎样的联系还不清楚（图16.8显示一个细菌同时具有S层和荚膜）。在古菌中缺乏肽聚糖或相应的分子，S层可能是细胞表面的主要成分。虽然S层蛋白能代表细胞丰富的蛋白质合成，但S层的功能还不清楚。许多实验室具有失去合成S层能力的菌株，但这些菌株仍然生长得很好。可以想象，当细菌生活在不需要合成S层的环境条件下，细胞不再继续合成S层无疑具有非常强的选择优势。

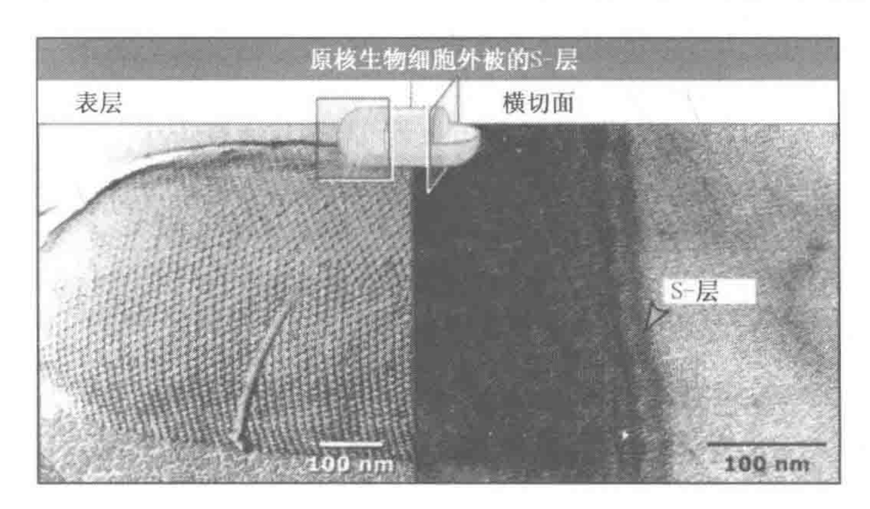


图16.9 一些原核细胞外被的表面层是一层S层而不是荚膜层。左：电子显微照片显示S层外表面的六边形对称性。右：电子显微照片显示具有S层的细胞外被的横切面。左图由奥地利维也纳自然资源与应用生命科学大学纳米生物技术中心的M. Sara和U. B. Sleytr（Sara, M. and Sleytr, U. B. J. Bacteriol. 182: 859-868. 2000 © ASM）惠赠。右图由奥地利维也纳自然资源与应用生命科学大学纳米生物技术中心的Christina Schaffer惠赠。

16.6 细菌细胞壁含网状结构的肽聚糖

关键概念

- 大多数细菌具有肽聚糖，是聚糖链通过短肽交叉连接而成的坚韧的细胞外部结构。
- 肽聚糖的前体在细胞质中合成，运输到细胞质膜外并在细胞质膜外组装。
- 细胞壁合成的一个模型是，蛋白质复合体携带新合成的细胞壁成分插入细胞壁中原有的成分中。
- 许多自溶酶可使细胞壁改变形状、修饰细胞壁和修复细胞壁。
- 对于有些细菌，细胞壁中的肽聚糖对于维持其形态起重要作用。
- 细菌蛋白 MreB（肌动蛋白的同源物）在细胞质中形成螺旋丝状结构，通过控制肽聚糖的合成决定细胞的形状。

大多数细菌细胞表面的主要成分是肽聚糖。它是聚糖链通过短肽交叉连接而成的结构。它覆盖在整个细菌细胞的表面，形成坚韧的保护外壳。肽聚糖对于一些细菌是非常重要的，因为它可以中和由于细胞内高渗透压给细胞带来外部的渗透压力。所以，如果细胞壁破裂对于细菌将是致命的。对于大多数细菌来说，肽聚糖对于维持细胞的形状同样具有重要作用。

通过染色特性可将细菌分为两个类群，革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌由于细胞壁结构的不同而导致对革兰氏染色反应的不同（见图 16.2）。革兰氏阴性细菌具有非常薄的肽聚糖层，也许只有单一层的聚糖链。组成形式本质上是二维结构，即短肽之间肽桥位于同样的二维结构的位置。然而，革兰氏阳性细菌则具有非常厚的肽聚糖层，具有多层聚糖链，肽桥可能位于不同的位置，并连接上下两层聚糖链。关于革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌肽聚糖合成为什么具有不同的方式还不清楚。一个可能的优势是，革兰氏阳性细菌厚的细胞壁更加坚韧，能提供更好的保护，抵抗细胞外的物理损伤，同时提供更好的支持作用，抵抗细胞内部的渗透压。

图 16.10 显示，聚糖链由重复的二糖单位，即 *N*-乙酰葡糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸（NAG-NAM）重复连接而成。聚糖链平均具有 30 个二糖单位，但却具有不同的长度分布。与 NAM 共价连接的是一个短肽，这个短肽不是在核糖体上合成的，并且其中插入了几个不常见的氨基酸，包括 D-谷氨酸、D-丙氨酸和二氨基庚二酸（diaminopimelate，DAP）（在 L-型细菌中，用于蛋白质合成的氨基酸总是不变的）。DAP 提供氨基基团，在肽桥交叉连接反应中起作用。交叉连接反应导致最后一个 D-丙氨酸从短肽链上释放（图 16.11）。在一些细菌中，短肽连接反应涉及额外氨基酸残基的参与。在革兰氏阳性细菌中，一个或多个甘氨酸作为连接的肽桥。

二糖单位前体是在细胞质中合成的，从尿嘧啶 5’-UDP-NAM 开始（图 16.11）。氨基酸在酶的催化下按照顺序依次加入。最终的 UDP-NAM-五肽在细胞质膜上连接到一个特殊的类脂载体上（细菌萜醇），这一结构顺利通过疏水性很强的细胞质膜并转移到膜外，便于插入到细胞质膜外已有的肽聚糖的生长点上。

将二糖前体插入到肽聚糖聚合物上需要两个酶的催化。转糖基作用（transglycosylation），产生聚糖链；转肽作用（transpeptidation）使短肽形成交叉连接。转肽酶是由于青霉素的结合而被发现，青霉素由于结合转肽酶而杀菌，所以也叫青霉素结合蛋白

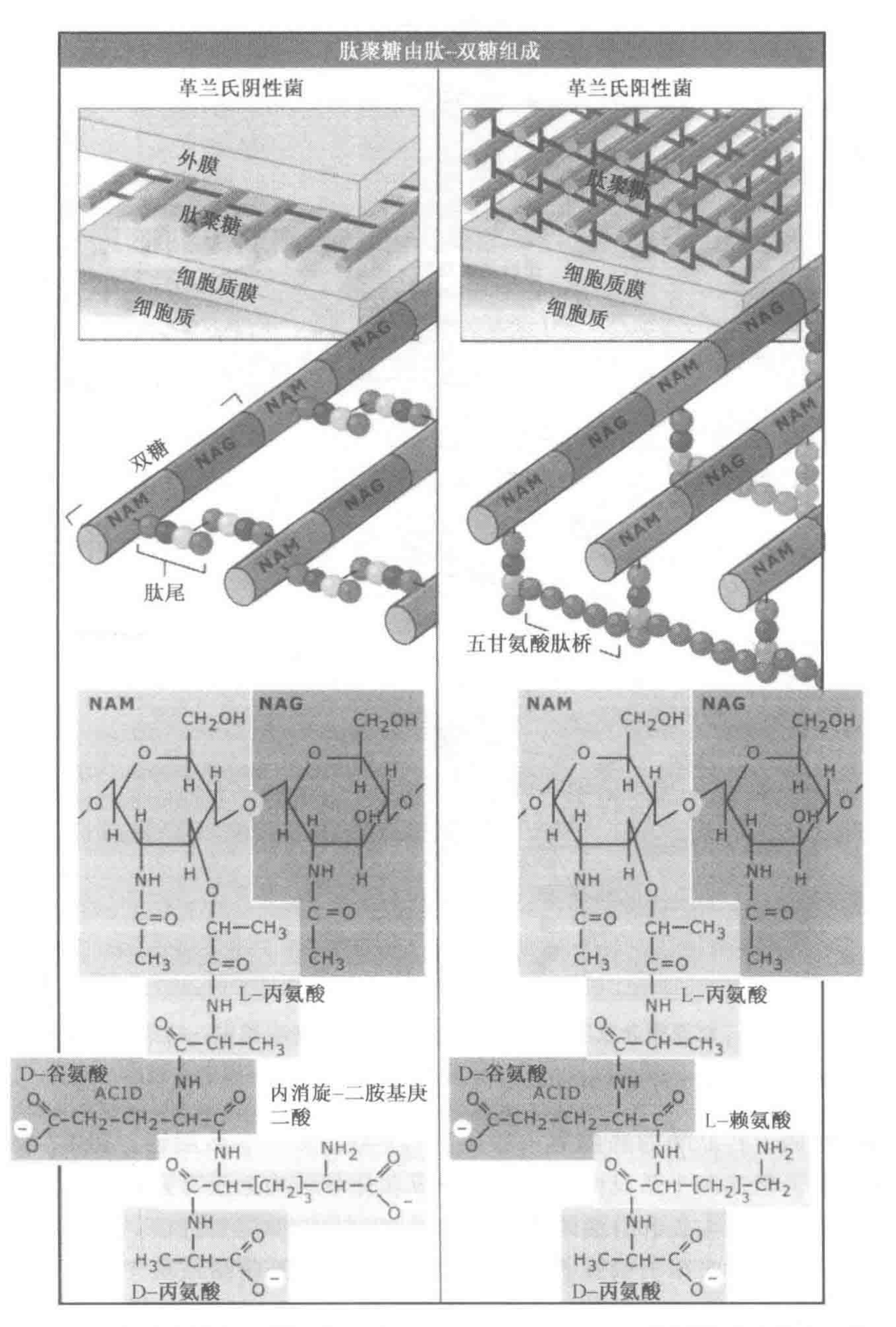


图 16.10 革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌肽聚糖层包含着同样的重复的二糖单位，但短肽的连接不同。一些革兰氏阳性细菌包括 L-lys，革兰氏阳性菌在相同位置上取代的是内消旋-二氨基庚二酸。双糖单位是 *N*-乙酰葡糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸（NAG-NAM）。

(PBP)。高分子质量的“A 类”PBP 是一个双功能酶，既具有转糖基结构域，又具有转肽结构域。

在杆菌中，细胞的柱状部分以及半球形的两极（细胞分裂时形成）似乎需要特殊的机制进行肽聚糖的合成。在大肠杆菌中，作为转肽酶的分别是 PBP2 和 PBP3。有一些

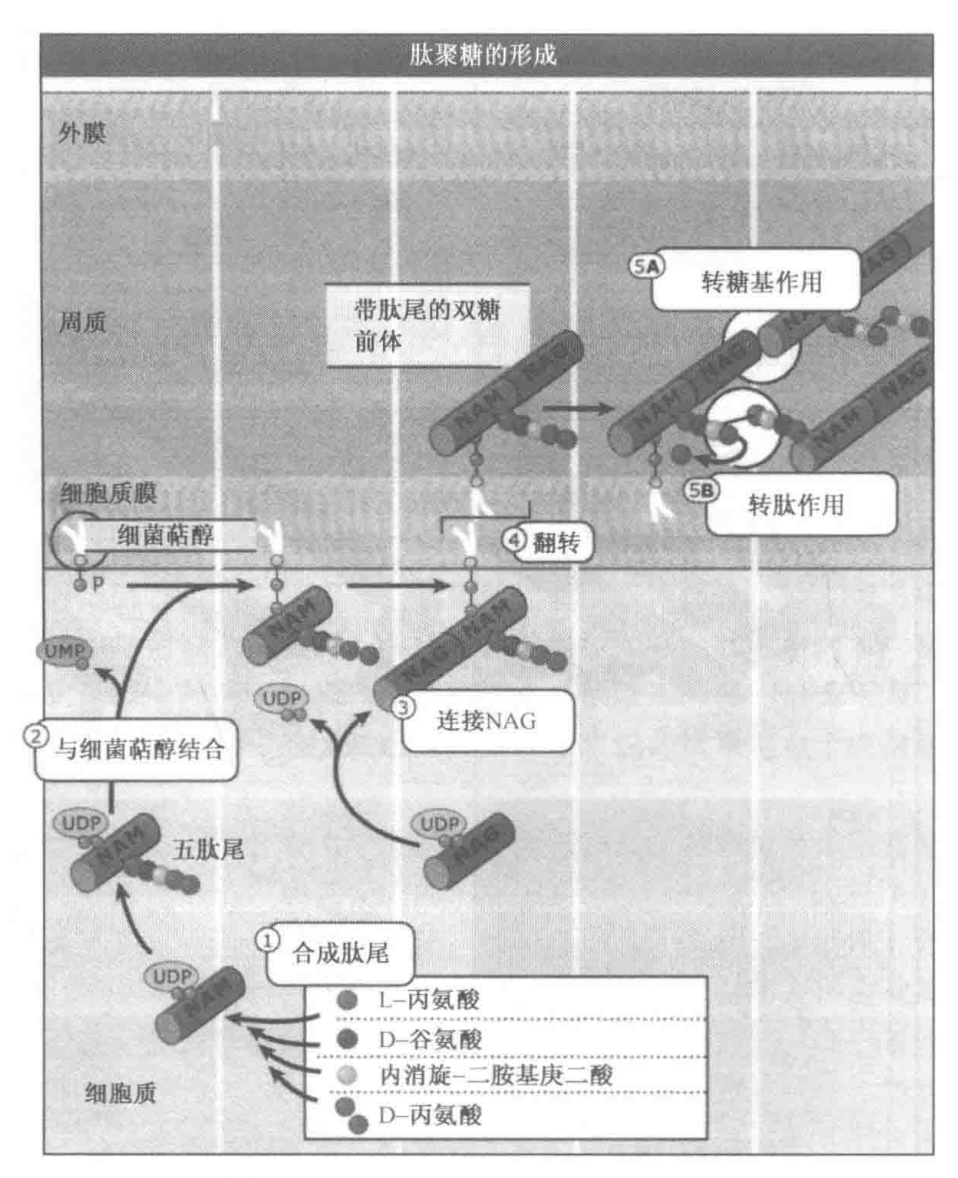


图 16.11　肽聚糖合成发生在几个步骤，起始于细胞质中，结束于细胞质膜的外部。在转糖基反应中，细菌萜醇从 NAM 释放（图中未显示）。

证据表明，这两个转肽酶的底物有一些不同，PBP2 要求 5 肽侧链，PBP3 要求 4 肽侧链或 3 肽侧链。但这两个系统中肽聚糖的合成在化学结构上没有发现不同。

对于一个细胞的生长和分裂来说，肽聚糖中的共价键需要打破，这样可以允许新成分的插入。一个具有吸引力的观点是，怎样安全地加入新物质取决于一个称为“打破前先制造”（make-before-break）的策略。换句话说，在细胞壁中的共价键打破之前新物质已经添加到“张力承受区”的细胞壁上（图 16.12）。整个过程是非常协调的，通过一个多功能的酶复合体进行催化，这个酶复合体包含 PBP，负责新的前体的插入，同时这个酶复合体具有水解酶活性负责旧物质的水解。在“三合一”（3-for-1）模型中，复合体包含 2 个双功能的转肽酶–转糖基酶，假设专一的转糖基酶合成一个“三倍包装（triple pack）”新的交叉链。复合体中 2 个单功能的转肽酶连接新转移到外面的新链到已经存在的链上的“模板”的链上。模板链随即被自溶酶所裂解，自溶酶是复合体的一个部分。虽然一些证据表明这些不同的酶是联系在一起的，但酶复合体的详细情况仍然有待研究。一个困难是，在许多细菌中检验这个模型时，发现在它们完整的 PBP 中表

现出大量的重复，当将 PBP 的编码基因进行破坏时，并没有出现明显的表型特征的改变。然而，大多数细菌在它们的细胞壁中具有复杂多样的自溶酶。这些酶分解肽聚糖底物不同的化学键。除了明显的分裂细胞壁在细胞分裂的末期使子细胞分开外，大多数自溶酶的功能是不清楚的［见 16.16 原核细胞分裂涉及形成复杂的细胞动力环（cytokinetic ring)］。对于 PBP，基因敲除多拷贝的自溶酶编码基因一般看不到明显的表型特征改变，也没有看到在细胞分开时细胞壁的延迟。

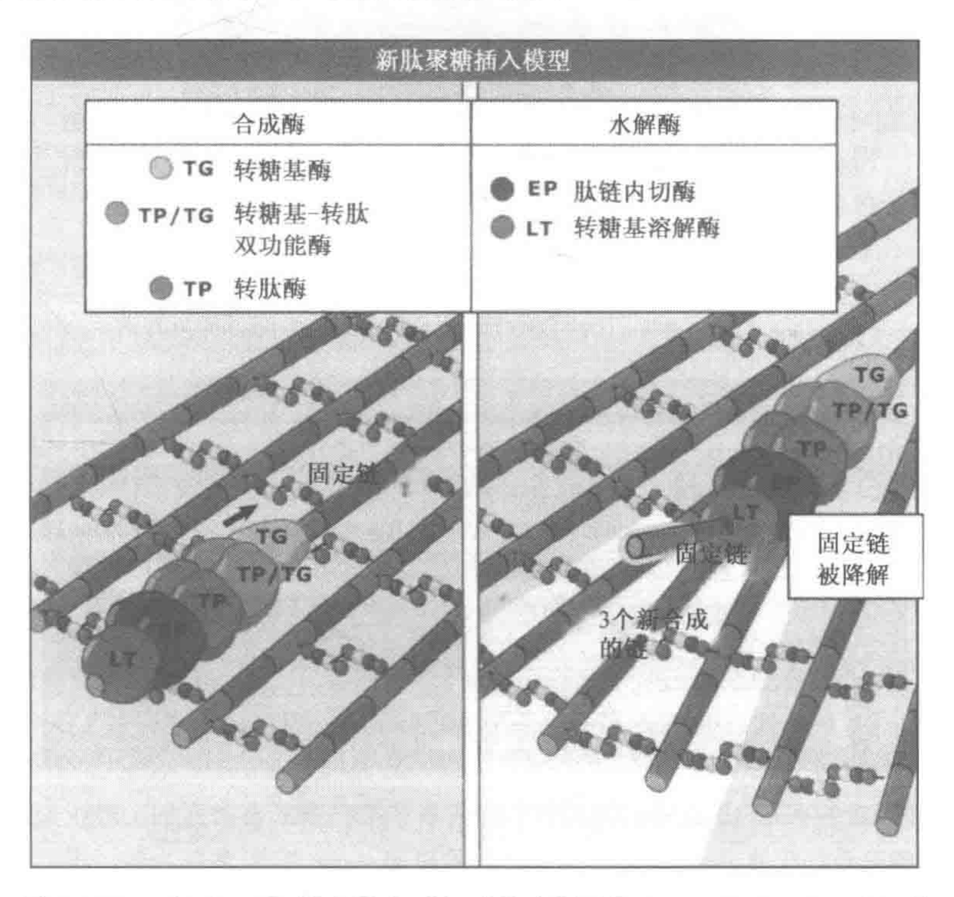


图 16.12 “3-for-1”模型提出“打破前先制造”(make-before-break) 的策略，解释新合成的肽聚糖如何插入原来就有的肽聚糖中。在这个模型中，一个多功能的酶复合体在已经存在的链上形成，合成 3 个交叉连接链，在已经存在的链被降解前，将新合成的成分插入已经存在的层中。

许多证据支持细胞壁中的肽聚糖对于维持细菌细胞的形状具有重要作用。首先，如图 16.13 所示，分离的细胞壁小囊保留被分离时细胞壁的形状。其二，如果用溶菌酶处理细胞壁，水解细胞壁，导致细胞正常形态的丧失。第三，细胞形态改变的突变常常涉及细胞壁合成基因。

近几十年来设想细菌不具有肌动蛋白细胞骨架，这一系统在真核细胞中负责细胞形状（见第 8 章肌动蛋白）。近来却发现，一个细菌蛋白 MreB 与肌动蛋白具有较低的序列一致性，但事实上它是肌动蛋白功能同源物。通过 X-射结晶体学分析三维结构，MreB 与肌动蛋白是一致的。*mre*B 基因首先通过突变被鉴定，在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中影响细胞形状。图 16.14 显示 2 个不同的枯草芽孢杆菌 *mre*B 基因同源物 *mre*B 和 *mbl*（*mre*B 类似物）发生基因突变对细胞形态的影响。*mre*B 基因在几乎所有细菌中都存在，具有非球形形状，但在球菌中是缺乏的。如果球形细胞的球型对称被打破，

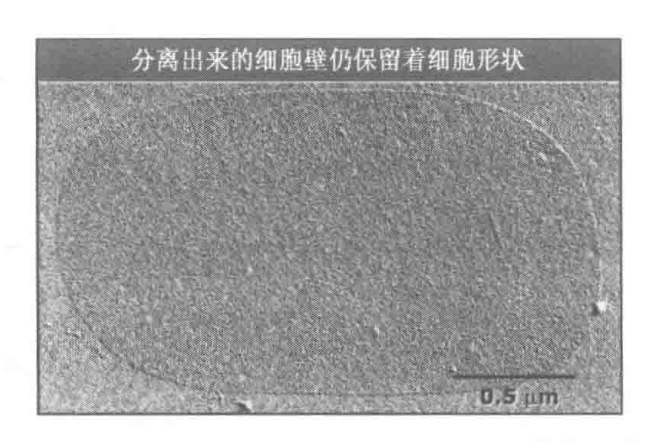


图 16.13　分离到的完整细胞壁小囊，显示二维结构。小囊是通过凝胶过滤分离的。电子显微镜照片由 H. Frank 制作，由 J. V. Holtje . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62：181—203. 1998© ASM 惠赠。

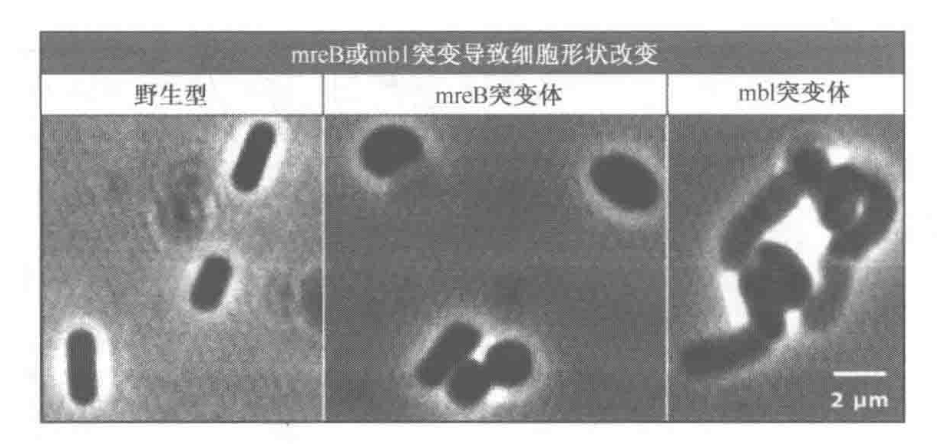


图 16.14　*mreB* 或 *mbl* 基因突变对枯草芽孢杆菌形态的影响。野生型细胞是杆状的，*mreB* 突变具有更圆的形态，*mbl* 突变是弯曲的。图片复制自 *Cell*，vol. 104，Jones，L. J. F.，Carballido-Lopez，R.，and Errington，J. Control of cell Shape…，pp. 913-922. Copyright 2001，获得 Elsevier 许可。

MreB 蛋白则参与一个系统，在这个系统中，决定杆菌（大肠杆菌和枯草芽孢杆菌）、弧菌（*Vibrio*）和螺旋菌（*Helicobacter*）的复杂形态。图 16.15 显示枯草芽孢杆菌细胞表达一个由 Mbl 编码区和绿色荧光蛋白组成的融合蛋白。表达的蛋白形成丝状结构，允许细胞质膜下的螺旋结构通过。这些结构不存在于拥有很强刚性结构的细胞中，因为这些细胞可直接决定自身形状。通过人工移走细胞壁，打破细胞的柱状形态而形成原生质体，Mbl 能松弛它们螺旋结构的构象。这似乎是通过直接合成新的细胞壁物质而工作，在这种情况下，在细胞生长中，细胞的整体形状和空间结构被保持。

关于 MreB 丝状结构怎样与细胞壁相互作用的精确机制还不是很清楚。然而，*mreB* 基因几乎总是位于 2 个保守的细菌基因 *mreC* 和 *mreD* 基因的上游。这 2 个基因同样对于保持正确的细胞形状很重要，它们编码跨膜蛋白，使细胞内 MreB 丝状蛋白与细胞外的细胞壁合成相耦联。

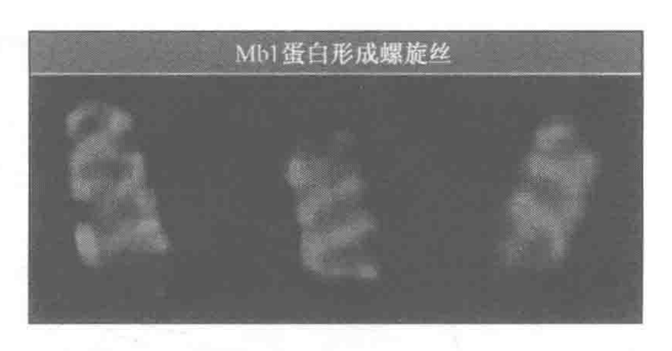


图 16.15　细菌 Mbl 蛋白与真核生物肌动蛋白具有弱的同源性，在细胞中形成螺旋丝状结构。显示 3 个枯草芽孢杆菌细胞表达 Mbl 绿色荧光蛋白。照片由 Oxford 大学的 Rut Carballido-Lopez 惠赠。

16.7　革兰氏阳性细菌细胞表面结构具有独特特征

关键概念

- **革兰氏阳性细菌具有厚的细胞壁，包含多层肽聚糖。**
- **磷壁酸是革兰氏阳性细菌细胞壁中的重要组成部分，但对其详细功能理解甚少。**
- **许多革兰氏阳性细菌表面蛋白共价结合到膜脂上或结合到肽聚糖上。**
- **分枝杆菌（*Mycobacteria*）具有独特的富含类脂的细胞表面成分。**

如前所述，革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌细表面结构具有明显的不同（见图 16.2）。一个主要的区别是它们的细胞壁组成。革兰氏阳性细菌具有较厚的肽聚糖层（见 16.6 细菌细胞壁含网状结构的肽聚糖）。另一个不同是革兰氏阳性细菌的细胞壁具有一个重要的多聚大分子。这些多聚物一般是多聚阴离子聚合物。研究最多的和含量最多的是磷壁酸。图 16.16 显示磷壁酸具有基本的重复结构，包含磷酸纤维素糖或甘油部分。这个多聚物通过一种或两种方式连接到细胞上。脂磷壁酸连接到细胞质膜上的脂肪酸上，壁磷壁酸连接到肽聚糖上。在不同的细菌中，即使在亲源关系较近的种中，发现存在大量不同的重复单位。这个聚合物具有共同的特性那就是阴离子聚合物，这是因为磷酸重复单位的存在。然而磷酸不是必需的，在磷酸限制的环境中，磷酸可被葡萄糖醛酸等其他重复单位所取代，形成磷壁酸。与肽聚糖相类似，磷壁酸是通过在细胞质中合成的 UDP-连接的前体，然后转移到细胞质膜外面进行组装。

磷壁酸对于细胞的生活能力是必需的，如果将其合成磷壁酸的基因敲除，会导致细胞死亡。虽然在某些情况下似乎与细胞壁的改变有关，但磷壁酸的精确功能还不清楚。已经假设了几个功能，它们对于捕获二价阳离子、在肽聚糖中控制自溶酶的活性或保持细胞壁的渗透性都是重要的。

革兰氏阳性细菌缺乏外膜，有两个机制固定细胞表面蛋白，防止这些蛋白质丢失到环境培养基中。首先，如图 16.17 所示，一系列的蛋白质通过基本分泌途径分泌出来后被特异的“类型Ⅱ”信号肽酶所裂解（基本分泌途径的细节见 16.9 细胞质膜是细胞分泌的选择性透过膜）。裂解前，具有酶活性的磷脂酰甘油：前脂蛋白乙二酰转移酶（prolipoprotein diacylglyceryl transferase）催化蛋白质与细胞质膜外层磷脂耦联在一起。蛋白质注定要进行这个**“脂修饰”（lipo modification）**，当信号肽酶裂解这个位点

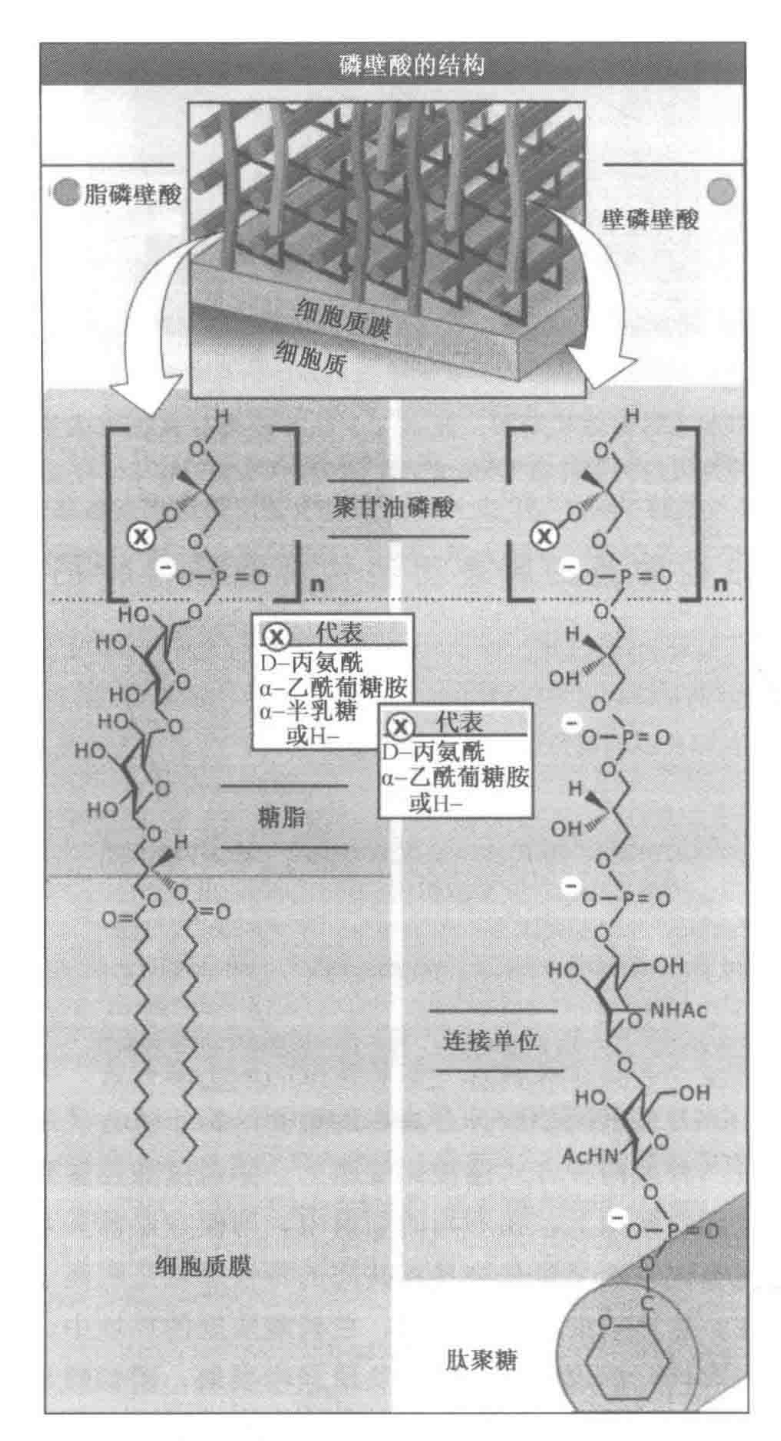


图 16.16 磷壁酸是革兰氏阳性细菌的细胞壁成分。磷壁酸通过与细胞质膜或与肽聚糖结合而连接到细胞上。

后，这一过程可被分选信号所识别，分选信号包含一个不变的半胱氨酸残基。蛋白质与细胞质膜外表面形成的共价连接可防止这些蛋白质从细胞表面扩散。在革兰氏阳性细菌中，大量的蛋白质以这种方式存在。预测枯草芽孢杆菌具有超过 100 个这样的蛋白质（虽然革兰氏阳性细菌经常使用这种机制进行表面蛋白质的连接，但革兰氏阴性细菌同样具有蛋白质的“脂修饰”）。

在革兰氏阳性细菌中，在细胞表面保持蛋白质的第二种途径是使蛋白质锚定到细胞壁中的肽聚糖上。一般来说，许多这样的细胞壁锚定蛋白与病原体和宿主之间的相互作用有关（这种趋势可反映出病原体基因组序列的偏好）。涉及这一过程的关键酶被称

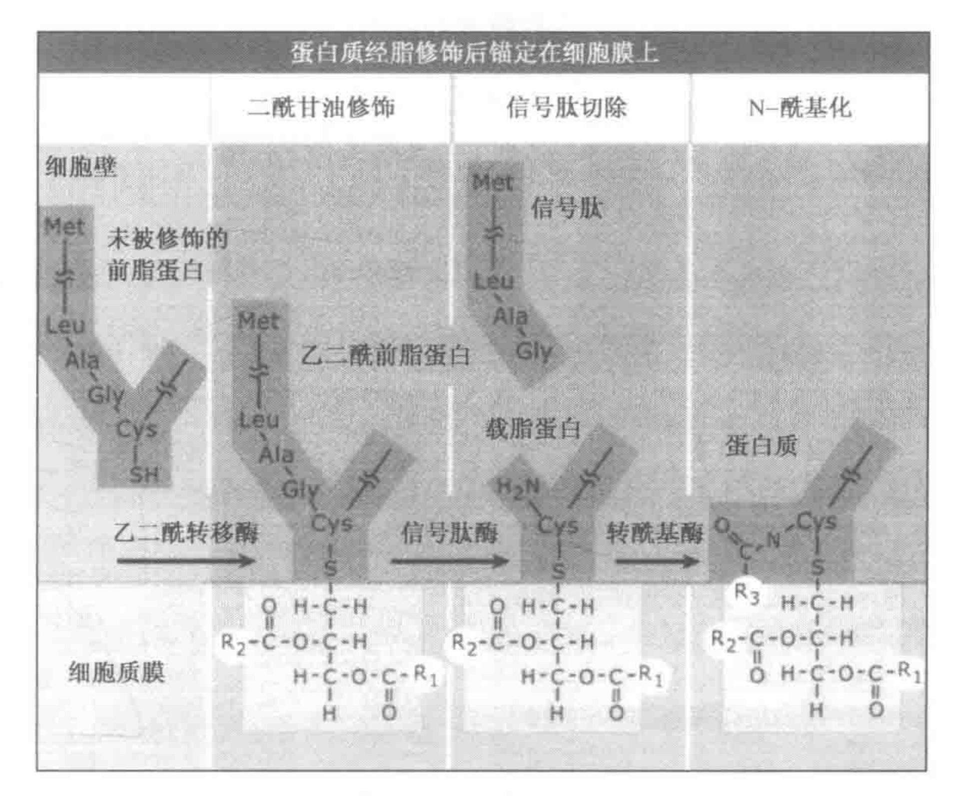


图 16.17 蛋白质锚定到细胞表面，蛋白质与细胞质膜上的磷脂相耦联是革兰氏阳性细菌的一种方式。R_1、R_2 和 R_3 代表脂肪酸长链。

为分选酶，见图 16.18。大量的底物已被鉴定，其中，金黄色葡萄球菌中的蛋白 A (protein A) 是研究得最深入的。细胞壁锚定蛋白在 N 端或 C 端都具有可识别的**序列模式 (motif)**。在 N 端具有经典的可裂解的信号肽，这对于蛋白质的跨膜外运是必需的（见 16.9 细胞质膜是细胞分泌的选择性透过膜）。在 C 端，位于疏水结构域后面是几个主要的阳性电荷残基。当分选酶发生酶反应时，这个结构域可能具有使 C 端靠近细胞质膜的功能。对于分选酶重要的识别序列位于 C 端疏水延长区前，包含一个短的氨基酸残基模式，一般为 Leu-Pro-X-Thr-Gly，其中 X 是任意氨基酸。当这个序列中的第 4 个氨基酸与肽聚糖中的酰胺连接时，这个蛋白质被裂解。虽然这个过程还没有最后确定，但推测分选酶催化这个过程。

革兰氏阳性细菌细胞壁合成的过程是从细胞内到细胞外，将新物质插入到细胞质膜外已经存在的细胞壁中（见图 16.19）。当肽聚糖成熟，它向外移动，直到到达细胞表面，在这里它最终通过自溶活性而被释放。根据当前的模型，肽聚糖以一种不十分确定的状态插入，并且随着细胞的生长而逐渐向外延伸。随着延伸的增加，新加入的物质最终成为承载，在这一点，它被水解从而允许新的增加。肽聚糖怎样成熟以及如何被自溶酶所控制与细胞的生长相协调，仍然是没有解决的重要问题。对于肽聚糖合成的**"三合一"模型**（这一模型发展出来以解释革兰氏阴性细菌细胞壁的生长）是否与多层的革兰氏阳性细菌细胞壁相关联仍然不清楚（这一模型的细节见 16.6 细菌细胞壁含网状结构的肽聚糖）。

对于细菌细胞壁的详细结构所知甚少，即使是研究得很清楚的枯草芽孢杆菌和大肠杆菌。虽然大多数的抗生素（特别是β-内酰胺类和糖肽类）通过抑制细胞壁的合成而起作用已经成为公认的事实，但对细胞壁合成的详细机制仍然所知甚少。这似乎是由于抑

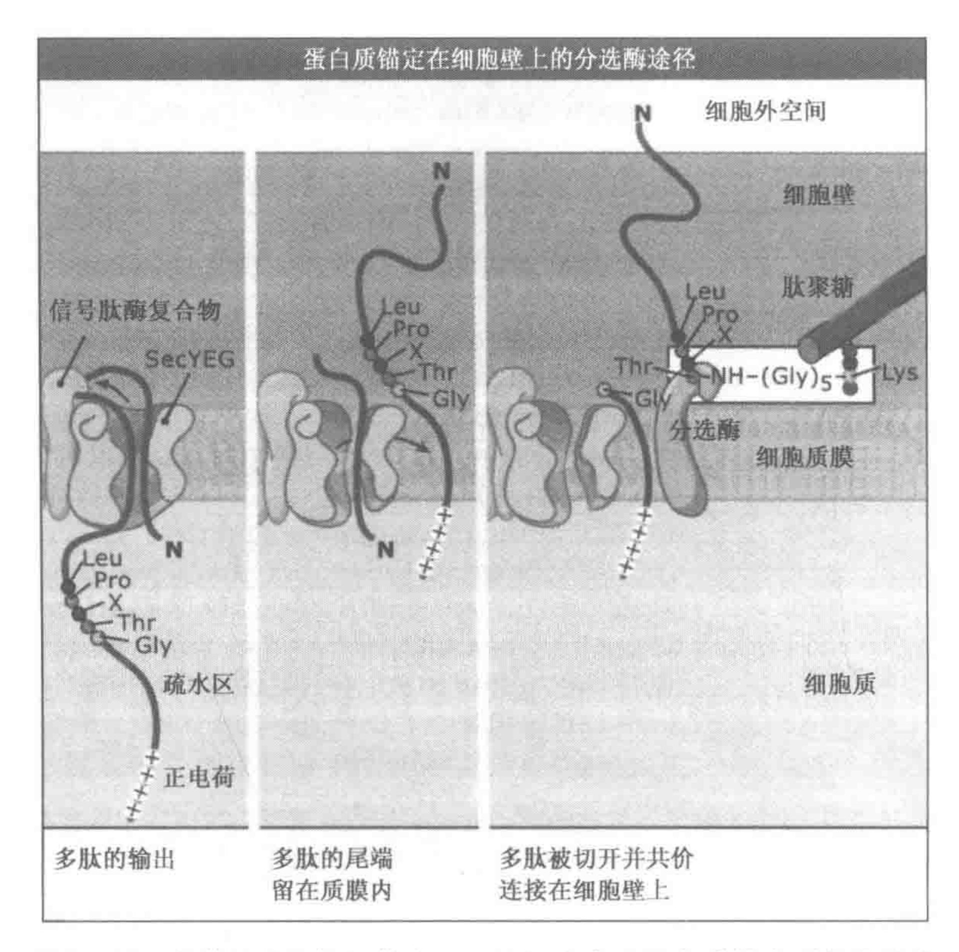


图 16.18　在革兰氏阳性细菌中，一些细胞表面蛋白质锚定到细胞壁的肽聚糖上。推测，分选酶（sortase）裂解 Thr-Gly 之间的化学键，使蛋白质共价连接到细胞壁上。

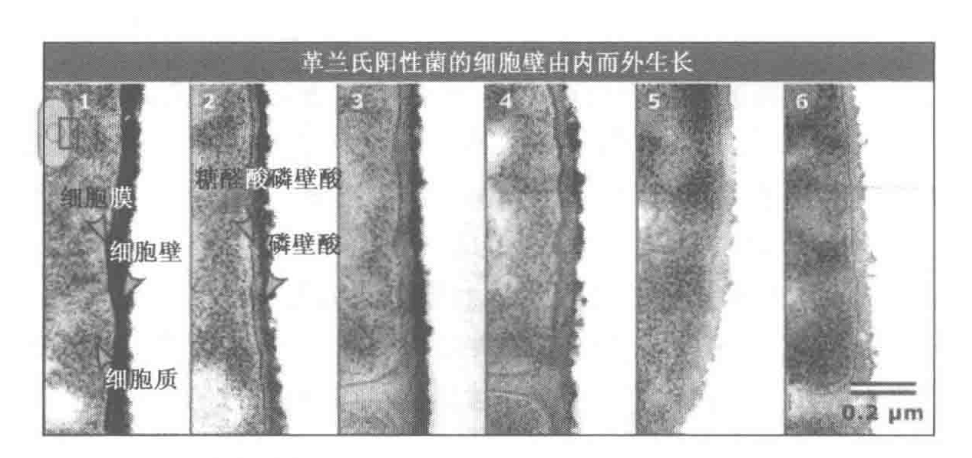


图 16.19　当从镁转移到磷酸盐限制的环境时，新的细胞表面物质在枯草芽孢杆菌沉积的时间过程实验。沿着整个细胞壁，旧的细胞壁（含有磷壁酸）被新合成的均一的壁物质所取代（包含糖醛酸磷壁酸）。图片经许可复制自 Merad，T.，et al. 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135（3）：645-655。

制剂与纯化的酶之间的相互作用成为生物化学研究的焦点。然而，PBP 合成肽聚糖与生长中的细菌细胞壁三维结构之间的相互关系仍然是一个没有解决的问题。同样，在不同的微生物中，细胞壁结构也不同。支原体是个极端的情况，它完全缺乏细胞壁，分枝

杆菌则具有复杂的脂肪酸以共价形式与肽聚糖连接。

16.8 革兰氏阴性细菌具有外膜和周质空间

关键概念

- 周质空间位于革兰氏阴性细菌细胞质膜和外膜之间。
- 跨越外膜的分泌蛋白常常与分子伴侣（molecular chaperone）在周质空间发生相互作用。
- 外膜是脂双层，可以防止大多数分子自由扩散。
- 脂多糖是外膜的主要成分。
- 当被革兰氏阴性细菌感染时，脂多糖可引起炎症反应。

相对于革兰氏阳性细菌，革兰氏阴性细菌具有外膜（见图 16.2）。位于细胞质膜与外膜之间的空隙称为周质空间（见图 16.20）。外膜的组成成分与细胞质膜的成分是不同的（见图 16.21）。在本节中，我们将突出周质空间和外膜的成分，以及周质的发生过程（细胞质膜的细节见 16.9 细胞质膜是细胞分泌的选择性透过膜）。

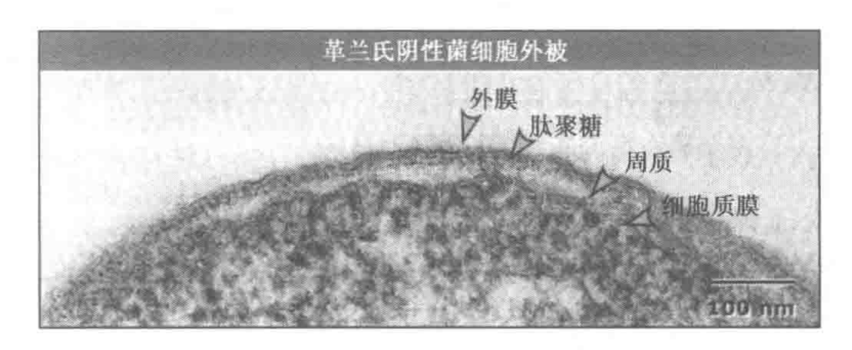


图 16.20 大肠杆菌 K-12 细胞外表面部分电子显微照片，由 T. J. Beveridge. *J. Bacteriol.* 181（16）：4725-4733. © 1999 ASM. Micrograph© T. J. Beveridge/Visuals Unlimited。

周质空间内具有许多类型的蛋白质，包括消化酶、转运蛋白质及与代谢有关的蛋白质。另外，许多发现于周质空间中的蛋白质能插入外膜或跨越外膜分泌（蛋白质分泌系统的细节见 16.10 原核生物具有几种细胞分泌途径）。这里我们将主要把周质空间作为一个蛋白质的折叠中心（folding center）。从某种程度上看，从氧化环境和蛋白质折叠的角度看，周质空间类似于真核细胞中的内质网（内质网的细节见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。许多蛋白质在周质空间中发挥分子伴侣的功能。分子伴侣以几种方式发挥功能：防止蛋白质出现它们最后折叠的构象；防止蛋白质自溶或防止与其他不希望的蛋白质发生相互作用，如果发生，将会导致蛋白质的聚集。

许多蛋白质含有自由半胱氨酸，在细胞质还原环境中不形成二硫键。二硫键形成对于许多周质空间蛋白和胞外蛋白质的折叠和稳定是非常重要的步骤，这一过程被位于周质空间中的二硫键异构酶所催化。周质空间蛋白折叠同样被脯氨酸残基的顺反异构化所影响。在伸展的蛋白质中，脯氨酸残基以反式（trans）构象占主导，但在折叠的蛋白质中，包含顺式和反式混合构象。在大肠杆菌中已鉴定出许多脯氨酰异构酶，这些酶可加快或减慢脯氨酸残基的顺反异构过程（真核细胞内质网上蛋白质折叠的细节见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。

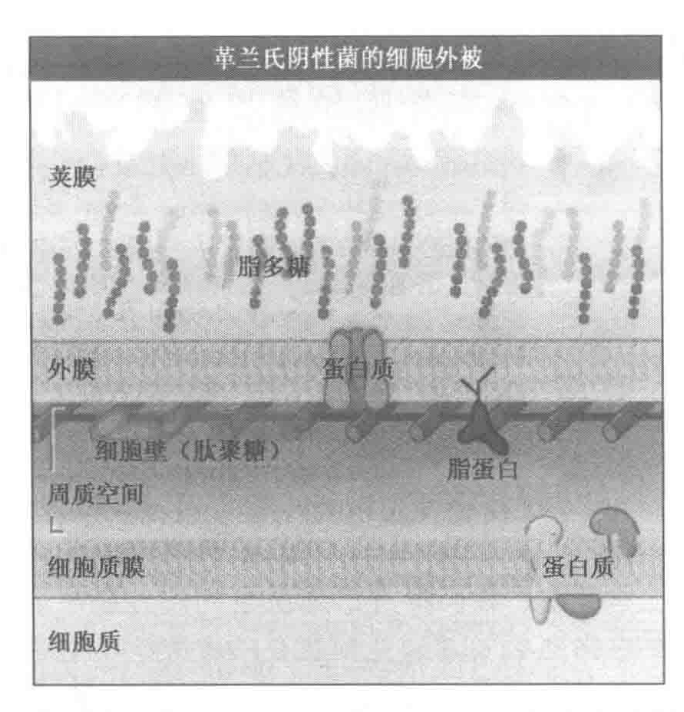


图 16.21 革兰氏阴性细菌细胞表面包括细胞质膜和外膜，两者被周质空间和细胞壁肽聚糖分开，这两个膜在组成方面具有明显的不同。

另一个关于分子伴侣的例子是蛋白质 DegP，促使细胞质中已经伸展的蛋白质的稳定。在大多数原核生物和一些真核生物中存在与 DegP 同源的蛋白质。DegP 是一个基本的分子伴侣，在许多类型的蛋白质上发挥功能。另外，周质分子伴侣如 DegD 对于 P-菌毛的发生是必需的，对于每种类型的底物都是特异性的。当菌毛亚基分泌到周质中，DegD 与菌毛亚基结合，防止它们彼此相互结合或与其他亚基结合（见图 16.28）。防止亚基-亚基相互作用而提前成熟只是其中的一个事件。DegD 同样是菌毛亚基的正确折叠所必需的，如果没有 DegD 存在，亚基将凝集并且通过蛋白水解作用而被降解（菌毛的细节见 16.11 **菌毛和鞭毛是大多数原核生物表面附属物**）。

尽管有分子伴侣的存在，蛋白质凝集仍然能在周质中发生，当这种情况发生时，Cpx 系统被激活。Cpx 系统由至少 3 个蛋白质组成，见图 16.22。周质空间蛋白质 CpxP 被认为在周质空间与凝集物或发生错误折叠的蛋白质结合，这将导致定位于细胞质膜上的 CpxA 蛋白被激活。一旦被激活，CpxA 在细胞质中的结构域被磷酸化，这个磷酸基随后被转移给 DNA 结合蛋白 CpxR。CpxR 的磷酸化可诱导多个基因的表达，包括编码周质空间蛋白酶的基因，这个酶可降解凝集蛋白质或错误折叠的蛋白质。其他被 Cpx 诱导的蛋白质包括有利于蛋白质折叠的蛋白质，如二硫化物氧化酶 DsbA、肽基-脯氨酰异构酶 PsbA 和 PpiD。

外膜是一个非对称的膜，外膜的里层由磷脂组成，类似于细胞质膜，外膜的外层由脂多糖组成（lipopolysaccharide，LPS），LPS 的结构见图 16.21。微生物种类不同，LPS 组成也有差异。但在大多数情况下，LPS 包括 *O* 多糖（*O*-polysacharide）、核心多糖和类脂 A（lipid A），见图 16.23。类脂 A 部分由脂肪酸如卷曲霉素、月桂酸（lauric）、豆蔻酸（myristic）、棕榈酸（palmitic）和不同的阻酸（steric acid）所组成。类脂 A 通过酯-胺连接到 *O*-多糖的核心区域。*O*-多糖一般由半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、

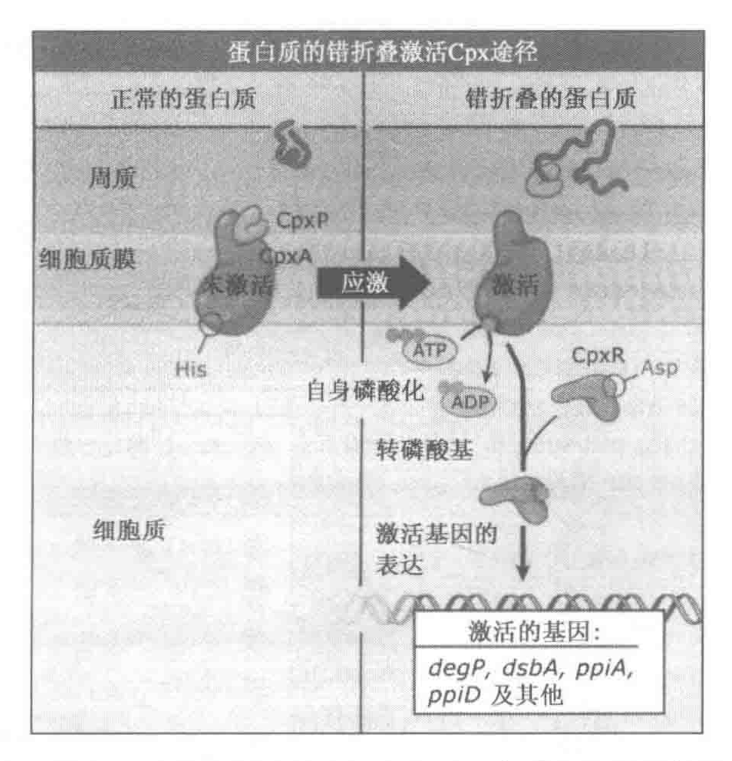


图 16.22 当细胞应急反应时导致细胞表面蛋白质发生错误折叠，激活革兰氏阴性细菌的 Cpx 途径。Cpx 途径被激活导致上游基因表达的调节，涉及蛋白质的折叠和蛋白质的降解。

甘露糖连接组成。这些糖具有分枝，形成 4 个或 5 个序列，重复排列形成 *O*-多糖。核心多糖由 *N*-乙酰葡糖胺、葡糖胺、庚糖、2-酮-3-脱氧辛糖酸等组成。脂蛋白通过插入和跨膜而使外膜锚定在肽聚糖层。

LPS 的重要的生物学特性是对人和动物的毒性。这是革兰氏阴性病原细菌导致疾病的因素。类脂 A 是 LPS 的毒性部分，常常被称为内毒素（endotoxin）。人和动物的上皮细胞和白细胞的细胞表面存在 LPS 的受体，能识别 LPS，引起炎症反应。这个反应包括高烧；减少淋巴细胞、中性粒细胞和血小板的数量；引起发炎。

16.9 细胞质膜是细胞分泌的选择性透过膜

关键概念

- 分子可以通过被动扩散或主动运输通过细胞质膜。
- 特殊的跨膜转运蛋白介导大多数溶质跨膜移动。
- 细胞质膜保持细胞质和外界环境的质子动力。

所有生活细胞都具有细胞质膜（或原生质膜），防止细胞内可溶性分子扩散到细胞外环境。对于原核生物，细胞质膜大约 8 nm 厚，这层膜区分细胞内与细胞外（见图 16.1）。细胞质膜包括脂类和蛋白质。细胞质膜的基本结构与大多数其他生物膜相似，包括磷脂双分子层。磷脂含有一个连接到三碳甘油骨架的磷酸，疏水的脂肪酸链连接到甘油骨架上的自由碳上，并调节相互之间的位置远离细胞外的水环境。相反，亲水的磷酸集团则暴露在水环境中。细胞质膜防止大多数生物大分子和离子通过被动扩散进出细胞（图 2.1）。一个例外是水，它可以扩散方式通过细胞质膜，因为它的个体小而且完

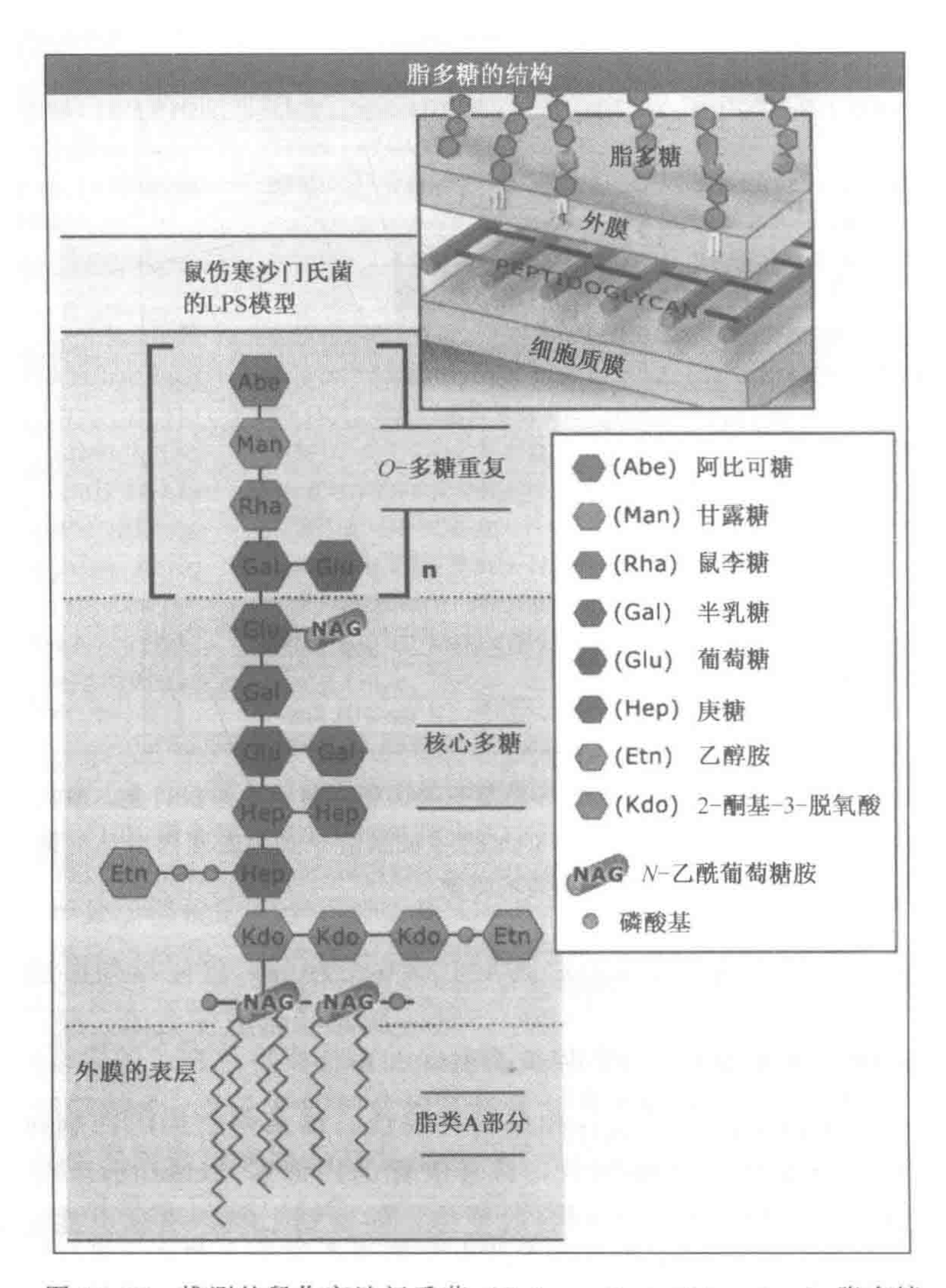


图 16.23　推测的鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）脂多糖的结构。

全缺乏电荷，所以使其能自由地通过细胞质膜。

许多类型的蛋白质与细胞质膜相联系。膜蛋白常含有延伸的疏水氨基酸，在膜中与疏水脂肪酸链相互作用。蛋白质的疏水区跨越膜，这些蛋白质往往嵌入膜中，成为膜蛋白。许多发现于细胞质膜中的蛋白质在物质进出细胞中发挥作用。这种跨膜运输可以是主动的，也可以是被动的过程。在被动转运中，分子从高浓度梯度移动到低浓度梯度。所以被动运输不需要能量。主动运输则允许不同浓度的可溶分子建立起膜内外之间的运输。转运蛋白是其中的重要机制，转运蛋白或者稳定地整合到膜结构中，或者是外围的蛋白通过氨基端的脂修饰锚定到细胞的膜表面。大分子如蛋白质，不能自由扩散通过细胞质膜，但能通过主动运输通过细胞质膜。这个运输系统常常具有很高的特异性，只运输单一的分子种类或一个保守的分子类群（跨膜转运的细节见第 2 章离子和小分子跨膜转运及第 3 章蛋白质的膜定向转移）。

ATP 结合盒（The ATP-binding cassette，ABC）转运体是原核生物中最大的蛋白质转运家族，在大肠杆菌中有超过 200 个成员。ATP 结合盒转运体能转运底物进入细胞内（图 16.24）或排出细胞外（见 16.10 原核生物具有几种细胞分泌途径）。ATP 结合盒转运体具有从离子到完整的蛋白质等很多类型的底物。在革兰氏阴性细菌中，ATP 结合盒转运体机构转运底物到细胞内包括 3 个成分：跨膜转运蛋白、周质底物结合蛋白、细胞质 ATP 水解蛋白。周质结合蛋白对于特异的底物具有高度的亲和性，从而允许底物转运，即使这些底物以非常低的浓度存在。ATP 结合蛋白在膜的细胞质一侧提供能量用于转运。这些蛋白质与膜结合稳定，一般通过脂的尾部连接到蛋白质的氨基末端。

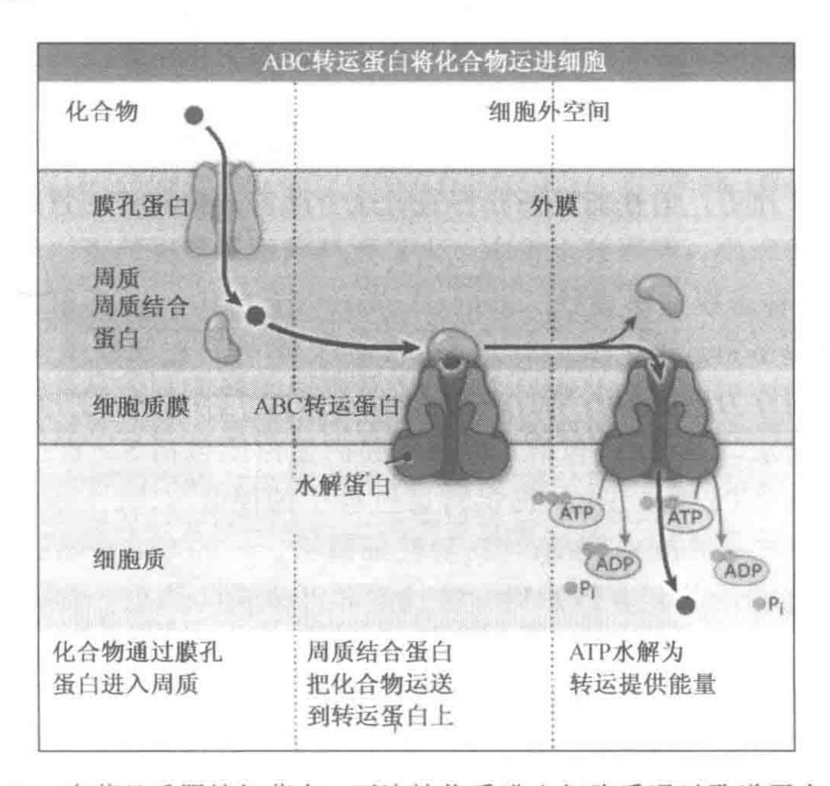


图 16.24　在革兰氏阴性细菌中，可溶性物质进入细胞质通过孔道蛋白（porin），即在细胞质膜上由蛋白质形成的具有一定大小的选择性孔结构。可溶性物质通过特异的周质结合蛋白在细胞质结合到 ABC 转运体上。转运需要消耗 ATP 的能量。

细胞质膜在原核生物能量代谢中发挥重要作用。在呼吸过程中产生的电子与细胞质膜上的电子受体相耦联。质子通过膜转运蛋白移动到细胞质膜外，导致膜外形成多的正电荷，而膜内则具有负电荷，产生质子梯度使膜具有能量。这种电化学梯度产生跨膜质子动势（proton motive force）。这个能量有利于质子沿着梯度从膜外移动到膜内，从而驱动许多细胞反应。换句话说，储备在细胞质膜上的能量能用于细胞内的其他过程。如在酶的催化下，质子动势驱动使 ADP 形成 ATP（见 2.20 F_1F_0-ATP 合酶将 H^+ 运动与 ATP 合成或水解耦联）。在氧化磷酸化过程中，几种膜结合酶复合体帮助形成质子动势。在氧化磷酸化过程中末端电子受体是氧。但在厌氧条件下，大多数原核生物能使用其他电子受体包括硫、氮、铁、锰作为末端电子受体。细胞质膜捕获的能量被用于细胞的许多生长活动，如大分子合成、蛋白质和分子的转运以及运动。理解这些途径如何提

供微生物生长所需能量的分子机制将是未来活跃的研究领域。

16.10 原核生物具有几种细胞分泌途径

关键概念

- 革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌使用 Sec 和 Tat 途径完成被转运的蛋白跨膜通过细胞质膜。
- 革兰氏阴性细菌还可转运蛋白质跨膜通过外膜。
- 病原菌具有特异的分泌系统来分泌毒素因子。

所有生活细胞都需要正确的大分子靶向。对于原核生物，接近 20%的蛋白质需要跨膜转运通过细胞质膜。对于所有细胞都存在蛋白质跨膜转运通过生物膜的问题。怎样使相对亲水的分子（蛋白质）通过相对疏水的区域（膜）。原核生物和真核生物都进化出类似系统完成蛋白质跨膜转运。蛋白质转运机制一般包括一个嵌入膜的蛋白质或蛋白质复合体形成一个通道，消耗能量使底物通过这个通道。被转移的蛋白质成为膜结合蛋白或在细胞外空间释放。在原核生物中，大多数跨越细胞质膜的蛋白质使用 2 个分泌系统：Sec 系统，也称基本分泌途径（general secretory pathway，GSP）。另一个是双精氨酸转运系统（twin arginine translocation，Tat）。另外，在细菌中至少存在 5 大类的特异分泌机制，被称为类型Ⅰ～Ⅴ。

如图 16.25 所示，Sec 途径包括几种嵌入膜的蛋白质包括 SecY 、SecE、SecG、一个周质空间结合的 ATP 酶，SecA 提供转运过程中的能量（Sec YEG 系统的细节，见第 3 章蛋白质的膜定向转移）。在革兰氏阴性细菌中，一些 Sec 底物需要细胞质中的分子伴侣 SecB，使这个分泌复合体达到一种伸展和可分泌的状态。在革兰氏阳性菌中还没有发现 SecB 的同源物。所有通过 Sec 途径转运的蛋白质都包含一个氨基端信号序列，靠这个信号序列使蛋白质靶向细胞质膜。信号序列一般是疏水的，但包括含有一个或多个阳性电荷残基的较短的氨基端亲水区域。虽然革兰氏阳性细菌信号序列比较长并且在氨基端具有更多的阳性残基，但革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌中发现的信号序列基本相似。通过 Sec 途径转运的蛋白质可以成为膜结合蛋白，释放到周质中或分泌到细胞外的培养基中。

除 Sec 途径外，另一个分泌系统称为 Tat，这个系统在细菌中是保守的。不同于 Sec 系统，Tat 系统可利用质子梯度将折叠过的甚至是寡聚蛋白质转运到细胞表面。Tat 系统不使用 ATP 水解作为能量驱动来完成分泌，不分泌伸展的蛋白质。事实上，Tat 系统可能拒绝错误折叠的底物。例如，PhoA 蛋白在正常情况下被 Sec 系统分泌，但如果将 Tat 特异的信号序列加在其 N 端，它可以成为 Tat 系统的底物。然而，如果在分泌到周质空间前通过基因工程的方法使其在细胞质中正确折叠，则 PhoA 只能作为 Tat 的底物。所以提出假设，在 Tat 分泌复合体识别它们前，所有底物必须被折叠。

组成 Tat 分泌复合体的蛋白质包括 TatA，B，C，以及 E。TatABC 构成膜复合体，TatE 似乎作为 TatA 的功能同源物。TatA 被认为形成孔道，TatBC 形成复合体并结合到底物的信号肽上。Tat 特异信号肽和 Sec 信号肽相似，但具有额外的特征。最突出的特征是保守序列 Ser-Arg-Arg-X-Phe-Leu-Lys 模式，这一模式仅仅位于氨基端区域的后面。因为含有两个精氨酸残基而使这个系统得名。虽然只有少数含有 1 个精氨酸，但几

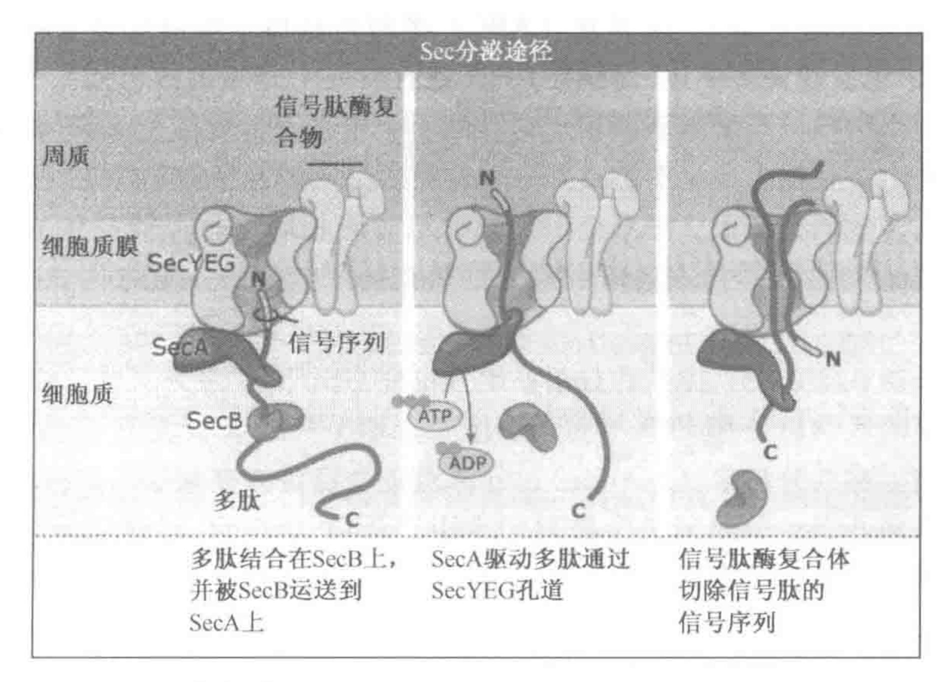


图 16.25　基本分泌途径（或 Sec 途径）中的蛋白质，转移新合成的蛋白跨过细胞质膜。

乎所有 Tat 的底物都含有 2 个精氨酸残基。

除了基本的分泌系统外，原核生物还有许多其他系统，直接负责蛋白质跨越细胞质膜，或在革兰氏阴性细菌中跨过细胞质膜和外膜。革兰氏阴性细菌中的 5 个主要的分泌系统见图 16.26。这些分泌系统中的许多是多亚基复合体。

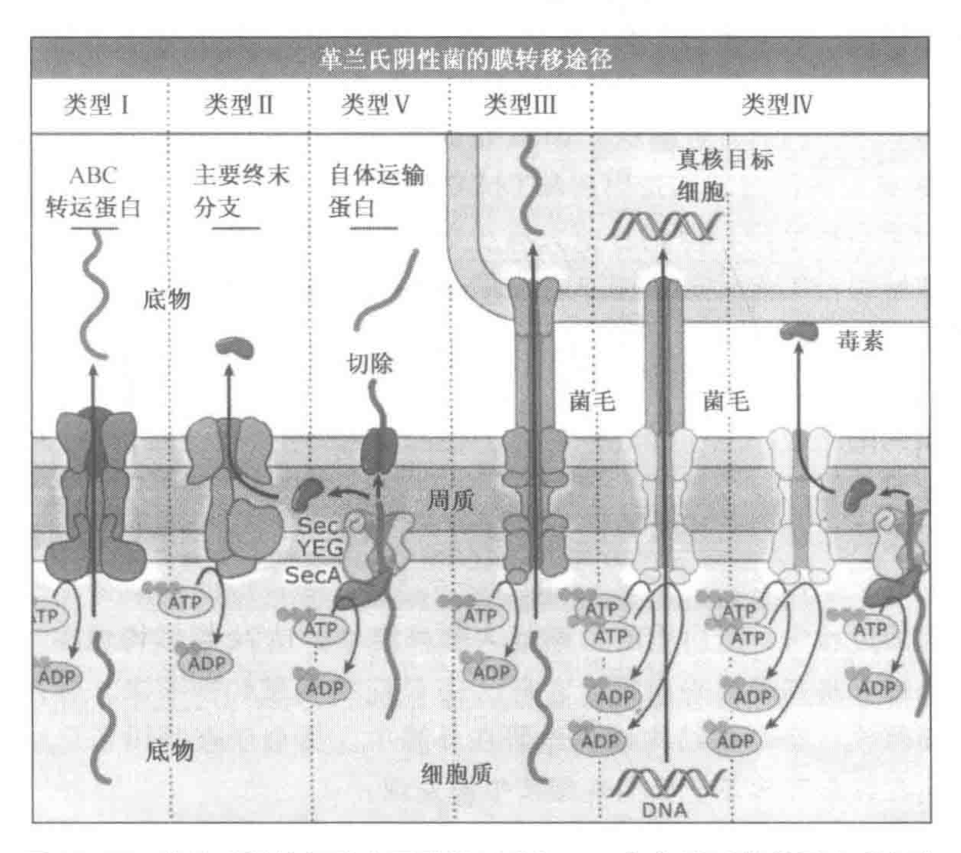


图 16.26　革兰氏阴性细菌主要膜转运系统。一些分泌系统是蛋白质复合体，跨越内膜、周质空间和外膜。

类型Ⅰ分泌机制是 ATP-结合盒（ABC）类型运载体，可以在整个细菌域中发现(在真核生物中也发现许多 ABC 运载体)。典型的类型Ⅰ分泌机构包括 2 个细胞质膜蛋白结构域。一个结构域与细胞质膜相结合，另一个包含 1 个或 2 个 ATP-结合盒。在革兰氏阴性细菌中，类型Ⅰ分泌系统具有一个外膜蛋白，转运底物跨过外膜。另一附属蛋白，出现在大多数的类型Ⅰ分泌系统中，与细胞质膜相联系，可能提供底物转运的特异性。类型Ⅰ底物是多样的，但研究最清楚的是病原微生物分泌的孔——形成毒素和降解酶。

在革兰氏阴性细菌中，类型Ⅱ分泌系统（也称 GSP 的“主要末端分枝”）主要负责许多 Sec 依赖的底物跨外膜的直接转运。主要末端分枝的特征是一个整合（integral）的外膜蛋白质，称为分泌素（secretin）。分泌素是个稳定的多聚体（10～14 亚基），通过外膜形成跨膜孔道。分泌素常常需要一个引导蛋白（pilot）以便正确地插入到外膜中。已经通过电子显微镜看到了分泌素，每个单体分泌素似乎是环形复合结构，中央孔直径 10～15 nm。设想，这个孔的大小对于折叠的或部分折叠的蛋白质的通过是足够的。

因为涉及宿主-病原体的相互作用，类型Ⅲ分泌系统被广泛研究过。在类型Ⅲ系统，底物从细菌细胞质直接转运到宿主的细胞质。许多可使病原菌侵入或在宿主内生长繁殖的毒素因子都是通过这种方式分泌的。通过类型Ⅲ系统分泌的蛋白质被认为不在周质空间停留。大约 20 个蛋白质与类型Ⅲ分泌系统有关，它们形成复合体，跨过细胞质和外膜，使分泌的蛋白质有效分泌到细胞外。在革兰氏阳性细菌中最近发现了类似系统（宿主-病原菌相互作用的细节见 16.20 原核生物可在高等生物上生存造成疾病）。

类型Ⅳ蛋白质分泌系统与 DNA 转化系统具有同源性。Ⅳ系统的蛋白质底物首先通过 Sec 系统分泌并跨膜。就像类型Ⅲ分泌蛋白，类型Ⅳ底物能被直接分泌到真核宿主的细胞质。一些类型的Ⅳ分泌系统，如根瘤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的 T-DNA转移系统，可同时转移蛋白质和 DNA 到宿主细胞。虽然类型Ⅳ分泌系统在许多革兰氏阳性细菌中被鉴定，但到目前只有少数分泌底物被发现。一个底物是百日咳毒素，被百日咳博德特氏菌（*Bordetella pertussis*）以**依赖类型Ⅳ**的途径所分泌。不同于农杆菌转移 T-DNA，百日咳毒素可直接从细菌细胞质分泌到宿主细胞质。百日咳毒素的分泌通过 2 个步骤，毒素通过 Sec 途径横跨细胞质膜，然后与类型Ⅳ机构发生相互作用，从而跨膜到细胞外。

类型Ⅴ分泌系统是一个单一的蛋白质，能直接指导自已跨越外膜进行分泌。这个系统称为自动跨膜转运体，这些蛋白质首先通过 Sec 机构释放到细胞质，如病原菌奈瑟氏菌属（*Neisseria*）利用自动跨膜转运体系统分泌蛋白酶，帮助侵染宿主免疫系统。在释放到细胞质的过程中，蛋白质的 C 端插入到外膜中，使 N 端结构域发生跨膜。当 N 端蛋白酶结构域分泌到细胞表面后，它自己从 C 端结构域切割下来。蛋白酶结构域随后从细菌表面释放，而 C 端结构域仍然留在外膜中。类似于奈瑟氏菌属中的蛋白酶的自动转运体也在许多其他革兰氏阴性细菌中被发现。

16.11 菌毛和鞭毛是大多数原核生物表面附属物

关键概念

- 菌毛是原核生物细胞外表面蛋白质性质的结构，介导许多功能，包括DNA交换、黏附、形成生物膜等。
- 许多菌毛是通过伴侣/引导途径进行组装的，是外膜的特征，引导蛋白质形成孔结构，通过这个孔，亚基被分泌，周质空间伴侣帮助菌毛亚基完成折叠，引导它们到特定部位。
- 鞭毛是胞外负责细菌运动的装置。
- 原核生物的鞭毛包括许多部分，其中的每个部分由蛋白质亚基通过独特的方式组装而成。

原核细胞从细胞表面向外衍生出2种附属物，菌毛和鞭毛。菌毛是表达在细胞表面的丝状蛋白质寡聚物（图16.27）。有不同类型的菌毛，如F-菌毛介导细胞-细胞之间的接合而使DNA发生转移。最初描述这些附属物时，称它们为菌毛（fimbriae），正是它们的出现使大肠杆菌获得凝集红细胞的能力。随后引入菌毛的概念，用来描述菌毛结构（F-pili）与微生物之间的接合转移遗传物质有关。从那时起，从遗传的角度把菌毛作为所有非鞭毛丝状附属物，与菌毛可相互替换。菌毛介导原核细胞与原核细胞以及原核细胞和真核细胞之间的联系，这是在细胞表面继续发育形成菌落的必需步骤，进一步进入宿主细胞，使DNA发生交换，发育为生物膜（见16.21 生物膜是高度有组织的生物群落）。菌毛可作为噬菌体的受体。对于大多数菌毛来说，其最基本的功能是提供特异吸附的支架。菌毛黏附亚基（adhesin）经常作为最小的成分加入到菌毛的顶端，但绝大多数结构亚基也可发挥菌毛黏附亚基的功能。吸附菌毛是细菌非常重要的定居因子（colonization factor）。如在泌尿系统发生感染时，类型Ⅰ菌毛对于致病菌大肠杆菌吸附到宿主表皮细胞是必需的。许多革兰氏阴性细菌组装类型Ⅰ菌毛。类型Ⅰ菌毛是复合结构，由一个厚的菌毛杆固定到薄的丝状顶端。在末端，菌毛黏附亚基FimH负责结合到宿主细胞甘露糖部分。

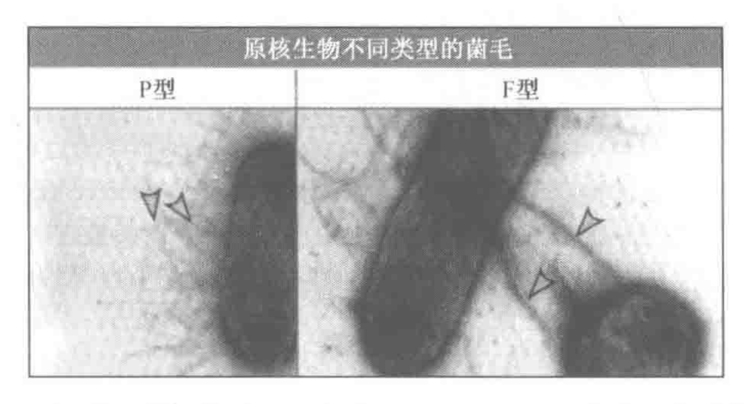


图16.27 原核生物2种类型的菌毛。P-pili比F-pili短些，与黏附有关。F-pili与细胞间接合转移DNA有关。左图由Matt Chapman惠赠，右图由Sydney大学生物学院的Ron Skurray惠赠。

菌毛的装配是很复杂的，涉及结构蛋白成为丝状和附属蛋白质，使菌毛蛋白亚基在细胞表面装配形成菌毛。所有菌毛成分（菌毛的结构成分）被运往革兰氏阴性菌细胞表面时，必须跨越细胞质膜，通过细胞质，跨过外膜。为了完成这些步骤，需要两个特

异的组装蛋白质：一个周质伴侣蛋白，一个被称为“引导员”（usher）的外膜转运蛋白。伴侣蛋白/引导员组装途径涉及超过 30 个不同类型的菌毛结构的发生。

伴侣-亚基复合体在细胞质形成并与引导员在外膜发生相互作用，在这里，伴侣蛋白被释放，暴露出亚基相互作用的表面，从而便于其组装成为菌毛（见图 16.28）。通过对 P-和类型Ⅰ菌毛系统的研究揭示出，吸附-伴侣复合体（PapDG 或 FimCH）与引导员具有很强的亲和性，吸附素是在菌毛上组装的第一个亚基。其他亚基逐渐加入到菌毛，部分亚基与引导员结合并进一步与伴侣蛋白形成复合体。除了作为菌毛生长组装的平台，引导员蛋白在菌毛发生中还具有其他作用。高分辨率电子显微镜揭示出，PapC 引导员与一个 2nm 宽的控制孔组装为一个 15nm 直径的环状复合体。当菌毛亚基在引导员上从伴侣蛋白游离后，亚基加入到正在生长的菌毛结构中。设想这一结构是成为仅一个亚基厚的线状纤维状，从而可以从引导员复合体中央孔突出。

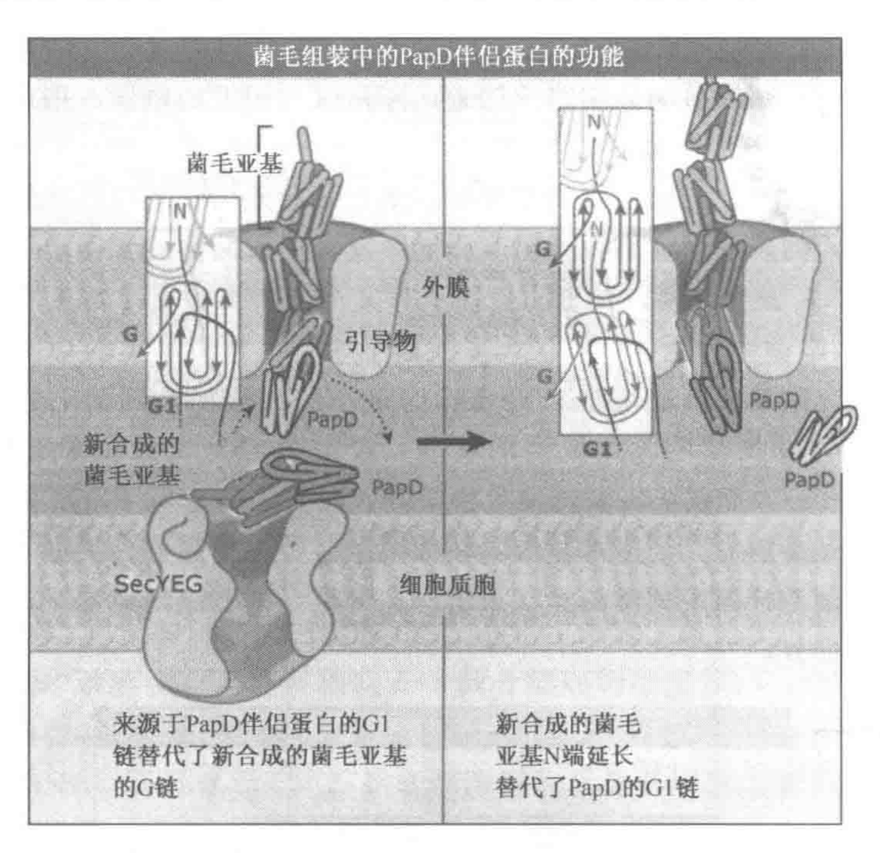


图 16.28 PapD 伴侣和膜蛋白引导体对于菌毛的正确组装是必需的。左：PapD 的 G1 链通过在两个链之间插入亚基，完成新合成的菌毛亚基的折叠。右：在菌毛组装的过程中，新合成亚基的 N 端链替换与原来亚基有联系的 PapD 伴侣的 G1 链。

大多数微生物能运动，常常依赖长的附属结构称为鞭毛，见图 16.29。革兰氏阳性和革兰氏阴性微生物在它们的细胞表面组装鞭毛。一个单一的、位于细胞一端的鞭毛称为单鞭毛的（monotrichous）或极鞭毛的（polar），多个鞭毛分布在菌体的表面称为周身鞭毛（peritrichous）。几根鞭毛长在一端称为单端丛生（lophotrichous）。细菌鞭毛与真核生物鞭毛不同，真核生物的鞭毛由微管及相关蛋白组成，并且被细胞质膜所包裹（见第 7 章微管）。

鞭毛很长，但一般直径很细，大约 20nm，如果不经过试剂进行鞭毛染色、增加直径，在光学显微镜下是看不到的。鞭毛可分为 3 个部分：鞭毛丝、鞭毛钩和基体（图

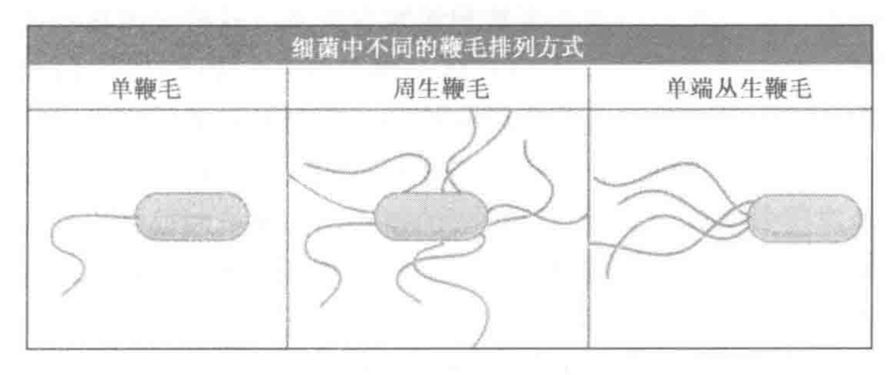


图 16.29　不同类型的细菌鞭毛具有不同的排列方式。

16.30)。鞭毛丝由重复排列的鞭毛蛋白组成。鞭毛蛋白在细菌域高度保守，这也意味着鞭毛介导的运动是基本的特性。鞭毛与细胞固定的位置称为基体，是非常复杂的多蛋白结构。鞭毛丝通过鞭毛钩与基体连接。在革兰氏阴性细菌中，基体横跨外膜、细胞壁肽聚糖和细胞质膜。L 环使鞭毛锚定到外膜。两对环，S-M 环和 P 环，使鞭毛分别锚定到细胞质膜和细胞壁上。在细胞质膜上，两个动力蛋白（moto protein）是驱动鞭毛运动的发动机。镶嵌在细胞质膜上的另一套蛋白质的主要功能是协调鞭毛的运动。由于革兰氏阳性微生物缺乏外膜，它们只含有 S-M 环。

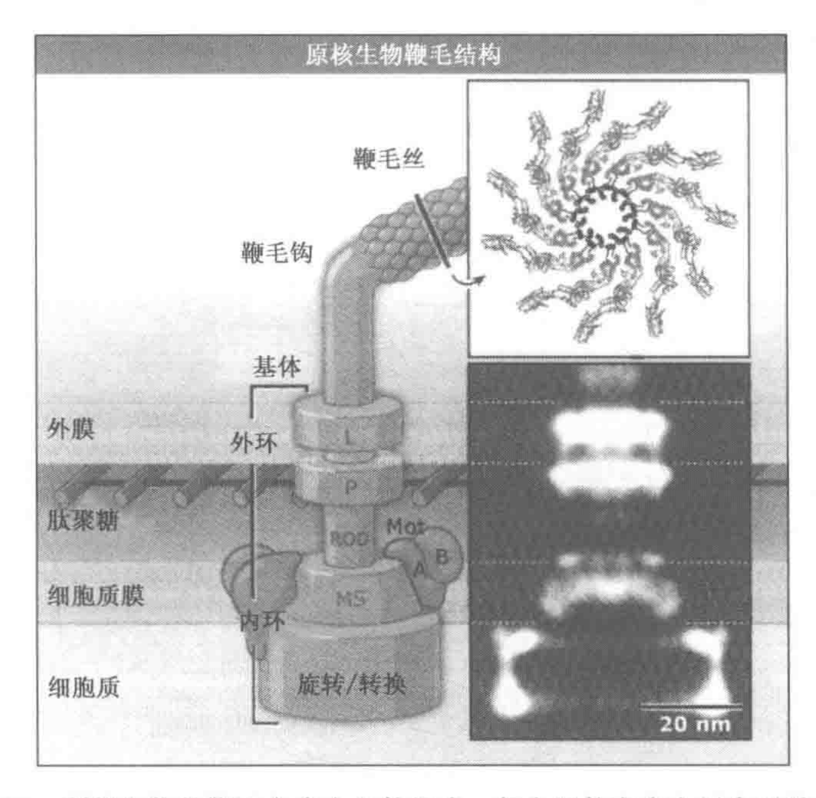


图 16.30　原核生物的鞭毛由多个组件组成，每个组件有多个蛋白亚基。上图显示运用冷冻电镜术获得的鞭毛蛋白结构，右下图是运用电子显微镜获得的鞭毛基体和鞭毛钩区域。鞭毛的鞭毛丝由鞭毛蛋白亚基螺旋排列而成，其中每圈有 11 个鞭毛蛋白亚基。右上图复制自 Yonekura et al. *Nature*. 2003. 424：643-650，获得 K. Namba 许可。右下图由 David DeRosier 惠赠，复制自 *J. Mol. Biol.*，vol. 235，Francis，N. R. et al.，Isolation，Characterization and Structure，pp. 1261-1270. Copyrighted 1994，获得 Elsevier 许可。

有几十个基因与鞭毛丝蛋白质的表达和组装有关系。这些基因按照组装的顺序被协调地调节。这样，首先被表达的基因与基体的组装有关，随后是鞭毛钩，最后是鞭毛丝。直到鞭毛钩的组装完成后鞭毛蛋白亚基的表达抑制才被消除。在这一点上，通过鞭毛钩孔道，负调节子被泵出细胞，重新启动被抑制的鞭毛蛋白的表达。鞭毛蛋白亚基通过生长的鞭毛被运输向外面，并加入到生长的顶端。这个机制保证直到鞭毛钩组装完成后鞭毛丝才能产生。鞭毛钩与另外的蛋白质分泌装置（apparatuse）有关（见 16.10 原核细胞具有几种分泌途径）。

当趋化性机制感受到有营养物质存在后，接着调整鞭毛的旋转方向。当不存在营养物质时，鞭毛默认的旋转方向是顺时针的，导致细菌进行翻滚运动（证明细菌趋化性的实验见BIO：16-0003）。细胞远离或朝向化学物质的运动被称为趋化性（chemotaxis）。在这里，我们把原核细胞的运动归因于营养物质（引诱物）的存在。不易弯曲的鞭毛利用由质子动力势提供的能量，像螺旋桨一样旋转，最终导致了细胞的运动。这种运动包含了一系列的直行和其间短暂的翻滚运动。当鞭毛逆时针运动时，细胞沿直线运动，而当鞭毛顺时针运动时，细胞将翻滚（如图 16.31）。因为随机的翻滚使机体处于一定的位置，因此可以预言运动的净距离可能是零。然而，朝向可利用的营养物的运动是在有规律的调节下进行的，细胞会以较少翻滚的方式朝向营养源运动，而当细胞远离

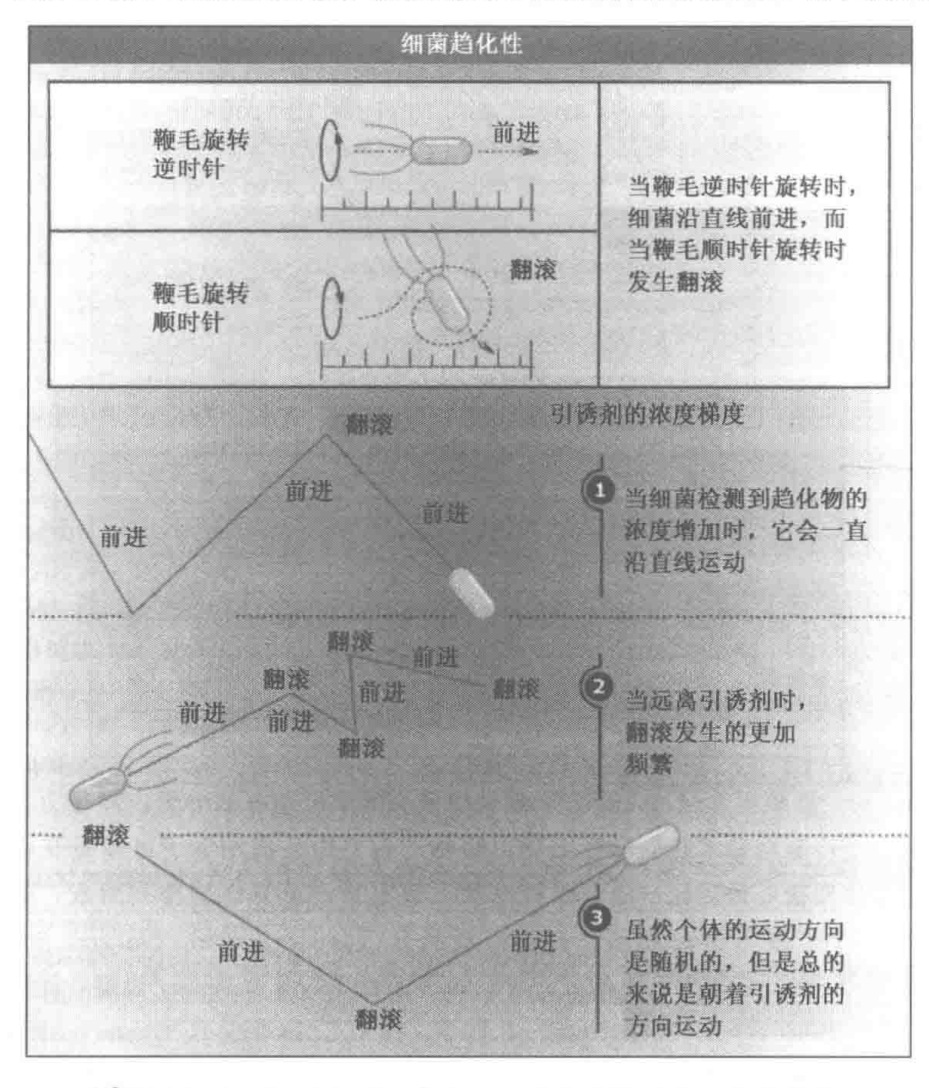


图 16.31　细菌分别以直线运动或翻滚接近和远离营养物。

营养梯度时，其间会增加翻滚的次数。尽管个体的运动方向是随机的，但是总体的运动方向是朝向引诱物的。

趋化性信号转导途径在原核生物中是相当保守的。只有支原体这一种微生物的基因组里不含趋化性基因。事实上，趋化性蛋白在所有的原核微生物中都是保守的，包括CheR，CheA，CheY，CheW 和 CheB。这些蛋白质利用复杂的磷酸化或甲基化修饰的级联系统，对引诱剂和有害物产生极其复杂的并且有效的适应性反应。我们在这里描述大肠杆菌中的这种途径。存在于细胞质膜中的受体与细胞外环境中存在的引诱剂或有害物结合。存在于细胞质膜上的 CheA 激酶与这些受体发生作用。CheA 使 CheY 发生磷酸化，使之可以与鞭毛动力蛋白结合在一起，引起鞭毛改变运动方向进而使细胞翻滚。磷酸酶 CheZ 可以使 CheY 发生去磷酸化。在引诱剂处于较低浓度时，CheA 发生自身磷酸化，接着把磷酸基转移到 CheY 上，然后 CheY 与鞭毛动力蛋白结合在一起，进而改变鞭毛的运动方向，引起细胞的翻滚。

还有一种复杂的趋化性系统，这个系统使细胞在朝向化学梯度时经常保持适应性变化，这样可以对出现的很小的浓度波动产生运动反应。这种短期的记忆是通过膜受体的甲基化实现的。CheR 可以使膜受体甲基化，而 CheB 使之去甲基化。受体的甲基化导致了 CheA 激酶活性的持续增加，进而使整个系统发生钝化。另一方面，CheA 可以使 CheB 发生磷酸化，这种修饰增加了 CheB 的甲基酯酶活性，从而为整个信号级联系统提供了反馈回路。

16.12 原核基因组包含染色体和可移动 DNA 因子

关键概念

- 大多数原核生物含有单一环状染色体。
- 噬菌体和可转移的质粒可以提高遗传的可塑性和适应性。
- 转座子和其他的可移动元件促进了原核生物基因组的进化速率。

大多数的原核生物含有单一环状染色体并且是单倍体。染色体以离散的实体结构——拟核的形式存在，关于拟核的详细内容将在下节讲述（见 16.13 细菌拟核和细胞质膜是高度有序的）。目前可以利用的基因组序列已经超过 200 个，它们的长度范围从 580Kbp（生殖支原体）到 9Mbp（链霉菌属、黏球菌属）。研究得比较详细的细菌如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的基因组的大小处于中等范围（4～5Mbp）。与高等的真核细胞的基因组相比，原核生物的基因组相对较小，原因是其基因非常紧凑，只含有非常少量的非编码 DNA。一般情况下，对于原核生物正常生长所必需的基因都在染色体上，各种可移动的遗传元件赋予了微生物遗传可塑性。

只有极个别的细菌种类含有线状的染色体或多个染色体或兼具这两种特征。例如，链霉菌具有线状染色体。染色体的末端是通过蛋白质桥连接在一起的，这也解释了先前的遗传图谱为什么是环状的。球形红细菌（*Rhodobacter sphaeroides*）含有两个大的环状染色体（一个 3.0Mbp，一个 0.9Mbp），每一个上面都含有大量必需的看家基因。莱姆氏病（Lyme disease）病原菌布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）拥有多个线状的染色体。

稳定的染色体外 DNA 元件并不含有必要的看家基因，对微生物的生命并非完全是必要的，被称为质粒。图 16.32 列出了一些了解得较为清楚的细菌质粒，并列出了其所

承载的基因。质粒通常相对来说很小，大小范围从 2 到 100Kbp 不等，并且是环状的。像染色体的情况一样，这其中也有例外，一些质粒可达到 1Mbp 或更大，并且有一小部分质粒具有线状结构。所有质粒都含有指导自主复制的基因，通常可利用宿主的 DNA 复制复合体中的各种元件。质粒所含有的重要基因包括抗生素耐受基因、病原性基因、降解外部碳源的基因。

细菌的质粒及功能			
功能	质粒	大小/kb	天然宿主
抗生素耐受（如氨卡青霉素，氯霉素，卡那霉素，四环素）	RP4	60	铜绿假单胞菌
产生抗生素	SCP1	356	天蓝色链霉菌
接合	F	100	大肠杆菌
重金属耐受	PI258	28	金黄色葡萄球菌
根瘤（共生）和固氮作用	pSym1	1400	苜蓿中华根瘤菌
致病基因	pWR501	222	弗氏志贺氏菌
植物致瘤	pTiC58	214	根瘤农杆菌
原噬菌体（细菌病毒）	P1	94	志贺氏菌属
利用外部碳源（如甲苯）	TOL	117	恶臭假单胞菌
UV（紫外线）耐受	pKW101	35	沙门氏菌属

图 16.32　细菌质粒及其功能实例。

质粒可通过多种机制来实现在机体间的传递。接合作用类似于交配的过程，包括含质粒的供体细胞和受体细胞之间直接的 DNA 转移。供体细胞中的质粒编码基因的功能有：可使供体细胞和受体细胞连接在一起，启动复制 DNA 的转移，并把 DNA 转送进受体细胞。质粒的转移也可通过直接的 DNA 摄取（转化作用）或者通过噬菌体介导的过程（转导作用）。不管有没有染色体外元件的存在，细菌基因组也可以通过同源重组和位点特异性重组使遗传物质发生改变（更多关于遗传学的资料见GNTC：16-0001和EXP：16-0001）。

对于很多细菌来说，噬菌体（细菌病毒）是遗传物质变化的重要来源。很多被测序的基因组含有整合的噬菌体（前噬菌体）。例如，大肠杆菌中至少包含 9 个，枯草芽孢杆菌有 10 个。其中的一些前噬菌体有明显的缺陷，包含明显的缺失和其他突变，并且表现出不可能被激活而产生有传染性的噬菌体颗粒。在一些例子中，前噬菌体包含的基因可赋予宿主选择优势；这其中包括限制和修饰系统，UV 抗性和致病性因素，如毒素（更多关于噬菌体的资料见GNTC：16-0002和MBIO：16-0005）。

最近发现，细菌的基因组也包含许多可移动的遗传元件，它们依赖于转座作用进行传递。插入序列是最小的元件，结构极其简单，仅仅具有一个单一的转座酶基因和侧翼序列，转座酶蛋白可以识别这段侧翼序列，进而启动转座反应。接着，宿主细胞中在 DNA 复制和修复中起作用的酶类出现，进而完成在靶位点的插入作用。更多的转座子含有附加的基因，可以提高宿主细胞的适应性。在细菌中，抗生素耐受基因是所知的转

座子中最著名的例子，而可作为转座子被转移的基因具有广泛的多样性。与转座子有关的元件可以催化多种形式的 DNA 重排，例如倒位和缺失（更多关于转座子的资料见 GNTC：16-0003和MBIO：16-0006）。

整合子是一种特别重要的适应基因组重排的结构。如图 16.33 所示，一般情况下，整合子包含一个整合酶基因，一个捕捉基因盒的临近的靶位点，还有一个强启动子用于启动被捕捉的基因的表达。基因盒常含有抗生素抗性基因，还含有可插入靶位点的序列，需要在插入酶蛋白的作用下完成。整合子通过不断地捕捉不同的基因盒而增加，促进细菌进化的速率，例如某些微生物对多种抗生素具有抗性。

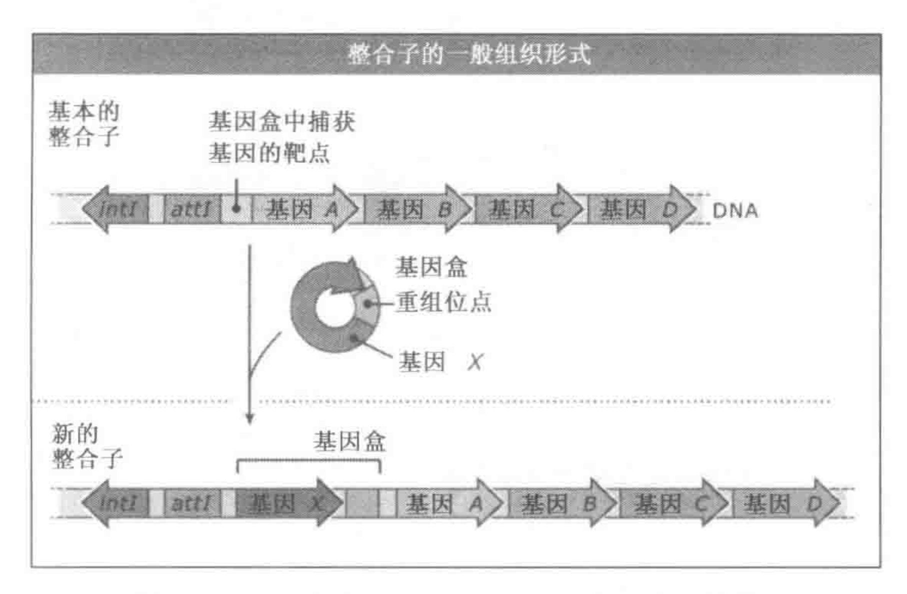


图 16.33　整合了若干基因盒的典型的整合子结构。

16.13　细菌拟核和细胞质膜是高度有序的

关键概念

- 细菌的拟核以弥散的一团 DNA 的形式存在，但却具有高度的组织性，并且基因在细胞中的位置不是随机的。
- 细菌不含核小体，但具有多种丰富的拟核结合蛋白可帮助组织 DNA。
- 在细菌中，转录发生在拟核区，翻译在其周围区域完成，类似于真核细胞的细胞核和细胞质。
- RNA 聚合酶可能对拟核的组织结构起到重要作用。

原核细胞由于缺少核膜而与真核细胞具有本质的不同。在真核细胞中，由于核膜的存在使转录和翻译的过程在空间上分开（见图 5.3）。在原核细胞中，没有膜把这两个过程分开，并且当 mRNA 还在被转录的时候，翻译就已经开始了。这种转录和翻译同时发生的现象对于一些基因的调控具有重要的影响（见MBIO：16-0007）。

细菌的染色体 DNA 以无定形的拟核形式出现，占据大部分细胞质的中心区域，如图 16.34 所示。拟核由染色体 DNA 和与之相结合的蛋白质组成。细菌不含有像真核生物和古菌中的可包裹染色体 DNA 的核小体结构（见第 6 章染色体）。然而，DNA 是被一系列丰富的拟核结合蛋白所包裹和组织在一起的，这些蛋白质被列于图 16.35。这些

蛋白质中最重要的是拓扑异构酶。这种酶控制着DNA的超螺旋，而超螺旋在DNA紧缩过程中具有重要作用。DNA的复制与转录则需要解螺旋才能得以进行。通过突变体了解到，染色体结构维持蛋白（SMC）家族也对拟核的组织结构有重要影响，但其中的机制还不清楚。在真核生物中，与SMC蛋白有紧密联系的蛋白在减数分裂和有丝分裂过程中涉及染色体的黏着和凝聚［见6.33 染色体固缩是由浓缩素（condensins）引起的，MBIO：16-0008］。这些不同的核相关蛋白共同作用，维持着染色体的超螺旋状态和拟核的紧缩状态。然而关于如何达到拟核的整体平衡的细节仍未被解决（更多关于拟核的资料见MBIO：16-0009）。

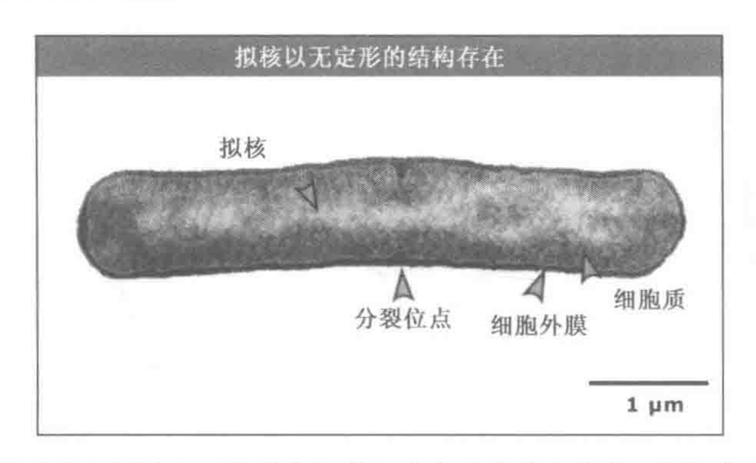


图16.34　电子显微照片显示拟核在细菌细胞内以弥散状存在。照片由Oxford大学的Jeff Errington惠赠。复制自Errington，J.，Murray，H.，and Wu，L. J. Diversity and Redundancy… *Phi. Trans. R. Soc.* 2005. 360：pp. 497-505。

大肠杆菌中与拟核组织有关的蛋白质		
蛋白	基因	功能
HUα，HUβ	*hupA*，*hupB*	高丰度拟核相关蛋白
H-NS	*hns*	类组蛋白的拟核结构蛋白，高丰度拟核相关蛋白
IHF	*ihf*	整合宿主因子；高丰度拟核有关蛋白
Gyrase	*gyrA*，*gyrB*	DNA超螺旋
拓扑异构酶IV	*parC*，*parE*	DNA超螺旋；可能在解链环中起作用（去除姐妹染色体的内部连接）
TopoisomeraseI	*topA*	DNA超螺旋
MukB	*mukB*	染色体凝缩
MukE	*mukE*	染色体凝缩
MukF	*mukF*	染色体凝缩
RNA聚合酶	*rpoA*，*rpoB*，*rpoC*	可能在转录RNA聚合酶时对限制DNA的结构起到主要作用

图16.35　大肠杆菌中与拟核组织有关的蛋白质。对于别的大多数种类的细菌来说，MukB，MukE和MukF蛋白都被SMC蛋白（structural maintenance of chromosome，SMC，染色体结构维持）和与真核凝聚凝缩蛋白有关的因子所取代。

尽管拟核以无定形的结构出现，但单个的基因在其中具有确定的位置。它们在拟核

中的位置反映在染色体图中的相对位置。这方面的第一个证据是在研究枯草芽孢杆菌在基因 *spoⅢE* 发生突变的突变体的特性时偶然发现的，如图 16.36 所示。在枯草芽孢杆菌形成芽孢的早期阶段会伴随着细胞的不对称分裂，但这种突变体不能正常地分离它的染色体。因此，在细胞的端部形成一个分裂隔膜紧靠着其中的一条染色体。在这些突变体细胞中，某些基因几乎总是被限制在紧邻端部的小室中，而其余的基因总是被排除在外。这种现象揭示了染色体总是处于特定的位置，并确定了首先进入隔膜的位点（芽孢形成的细节见 16.17 原核细胞通过复杂的机制对刺激发生反应）。

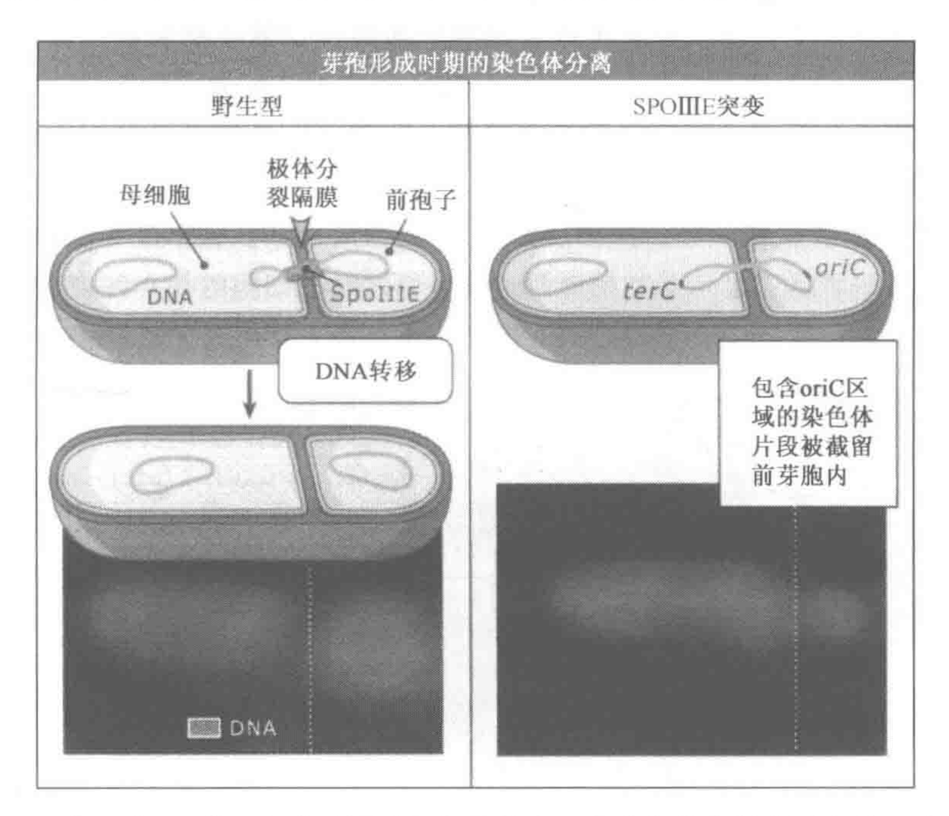


图 16.36　芽孢形成时期，极体分隔后染色体分离。当枯草芽孢杆菌形成芽孢时，菌体不对称地分裂成母细胞和小的前孢子。每个细胞获得一个染色体拷贝。染色体分离进入到芽孢的过程分为两步。首先，极体分离隔膜紧密环绕染色体，之后 SpoⅢE 蛋白把染色体的 2/3 转移到前孢子内。在 SpoⅢE 蛋白突变体内，只有 1/3 的染色体被转移到前孢子内。分析 SpoⅢE 蛋白突变体中被截留在前孢子内的染色体片段表明只有特定的片段被转移进来，这就意味着在细菌分裂前，染色体已被安排在特定的位置并且进入到前孢子的顺序也是确定的。荧光显微照片显示的是野生型的和 SpoⅢE 蛋白突变体细胞中的芽孢形成时经染色的 DNA。照片由 Oxford 大学的 Jeff Errington 惠赠。复制自 Errington，J.，Murray，H.，and Wu，L. J. Diversity and Redundancy… *Phi. Trans. R.. Soc.* 2005. 360：pp. 497-505。

更多的直接证据来自荧光原位杂交（FISH）技术的应用，可以直接看到特定基因在细胞中的位置。然而，这种技术要求样品的固定和其他严格的处理，以利于探针与目的 DNA 杂交。目前也应用了另一种方法，这种方法利用了绿色荧光蛋白和 DNA 结合蛋白（LacⅠ）的融合体，这个融合体可以与细胞内一系列不同位置的特异结合位点结合。通过这类实验，很清楚的是细菌的基因不是自由地分布在细胞各处，而是被严格限制在某些特定位置。一般情况下，染色体的 *oriC* 区位于拟核的一端，而 *terC* 区位于另一端。

从遗传图谱上可以看出，这两个位点之间的基因在拟核中或多或少都是成比例分布的。

在细菌细胞中所有的转录作用都利用同一个 RNA 聚合酶，包含两个 α，一个 β，以及一个 β' 亚基。启动子特异性是由一系列的 sigma（σ）因子决定的，它们也是转录起始所必需的，但当转录开始后就从核心酶上解离下来。转录的调节是通过广泛的辅助调节因子实现的，它们通常可结合到启动子附近的 DNA 上，以激活（刺激）或阻遏（抑制）转录的启动。其他的转录模型表现在转录终止（衰减作用）或者是 mRNA 的稳定性上（更多关于转录调节的资料见MBIO：16-0010）。

大多数的 RNA 聚合酶核心酶存在于细胞中部的拟核区，推测在这儿存在大量的转录作用。相反的，核糖体和各种与翻译有关的蛋白质在细胞边缘含量较丰富。因此，如图 16.37（见图版）所示，甚至在没有核膜的细菌中，转录和翻译过程在空间上也是分开的，这种情况与在真核细胞中类似。但是，越来越多的证据表明，在细菌中转录和翻译过程可以紧密地耦联在一起。这种现象与 RNA 聚合酶和核糖体没有同时存在于同一个地点并不矛盾。一种可能是转录和翻译两过程可以同时在细胞的核心和边缘之间的部位发生。关于拟核的组织形式以及细胞的核心区和边缘区是怎样维持的机制仍然所知甚少。

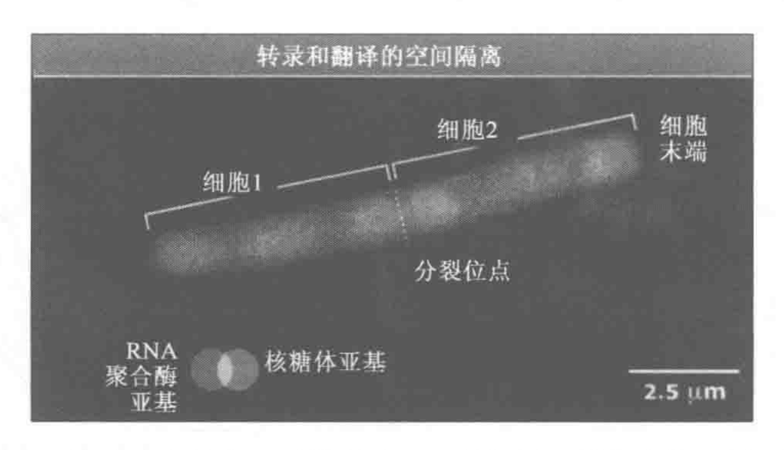


图 16.37　在细菌细胞内虽然没有核膜隔离，但是转录和翻译依然在相互隔离的区域进行。图中显示枯草芽孢杆菌区分的过程。图中绿色代表的是绿色荧光蛋白（GFP）结合的核糖体亚基 RpsB，红色代表的是 GFP-UV 结合的 RNA 聚合酶 RpoC 亚基。照片复制自 Lewis，P. J.，Thaker，S. D.，and J. Errington. *EMBO J*. 2002. 19：710-718. Copyright© Macmillan Publisher Ltd。

16.14　细菌染色体以一种特殊的复制方式进行复制

关键概念

- 在细菌细胞周期中，DNA 复制的起始是关键控制位点。
- 复制是从叫做 *oriC* 的固定位点双向进行的。
- 复制是在特异的“工厂”内组织进行的。
- 复制重启蛋白（replication restart protein）使复制叉从开始到终点的过程顺利进行。
- 环状染色体通常具有终止机关，可以确保复制叉在复制终止区聚集。
- 环状染色体需要特殊机制共同协作完成解连环作用，二聚体解离、分离以及细胞分裂。
- SpoⅢE（Ftsk）蛋白可以通过转移被滞留在分裂隔膜中的任何 DNA 片段的方式，完成染色体的分离。

细菌细胞中染色体复制是在一个被称为 *oriC*（origin of chromosome replication）的固定位点开始的，并且是双向进行的，也就是说，复制叉是按照顺时针和逆时针双向进行的。整体来说，复制是高度连续的过程，并且复制叉将在 *oriC* 区的相反端，叫做 *terC*（terminus of chromosome replication）的区域汇合（更多关于 DNA 复制的资料见 MBIO：16-0011和MBIO：16-0012）。

复制在被称做复制“工厂”的不连续的位点上进行，那里是复制复合体的亚基聚集的地方，如图 16.38 所示。对于枯草芽孢杆菌的复制“工厂”在细胞周期中的分析表明每一轮的复制开始的区域都是固定的。因此，每当复制相关蛋白发生聚集时，大约就预示着一轮 DNA 复制的开始。这种现象与复制叉从 *oriC* 区开始双向进行的传统观点是相反的。这种观点认为，顺时针和逆时针方向的复制叉是定位在一起的。这种位置上的一致，预示着它们可能共享同一系列的复制蛋白质，甚至是一系列复制所用的核苷酸三磷酸前体。

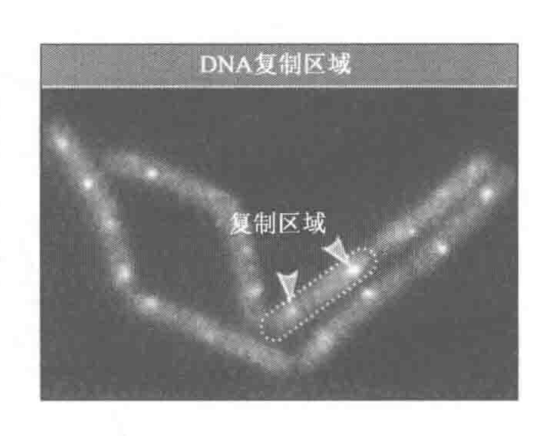


图 16.38　分裂细胞中 DNA 复制“工厂”荧光显微图。图中亮点代表的是由绿色荧光蛋白和 DNA 聚合酶全酶的 DnaE 亚基组成的融合蛋白。在此生长条件下，每个细胞有两个正在复制的拟核，每个上面都有一个复制“工厂”。照片由 Oxford 大学的 Richard Daniel 惠赠。

按照细胞中复制的整体组织形式，图 16.39（见图版）描绘了复制定位模型。在染色体复制开始时，*oriC* 区就形成了复制“工厂”。新复制的 *oriC* 区出现在复制复合体的两端，并且两个复制叉位于同一个复制复合体上。当复制继续进行时，未被复制的染色体被卷进位于细胞中部的复制“工厂”，而新复制的 DNA 被驱赶到细胞的两端。*oriC* 区向着细胞的两端分离。*terC* 区定位在细胞中部的还未被复制的收缩成一团的 DNA 上。最终，当 *terC* 区被复制后，一轮染色体的复制才完成，接着复制“工厂”解体。

复制“工厂”模型可能帮助证明 DNA 复制在体内的惊人的持续合成能力。复制叉很少不经过停顿就从起点一直到达终点。DNA 的损伤和 RNA 聚合酶的停滞都可以使 DNA 的复制发生滞留。细菌细胞有一系列的机制使停止的复制叉在 DNA 链修复之前或之后重新启动（细节见MBIO：16-0013）。也可防止重要的蛋白质在复制复合体上变得松散，使之与新合成中的 DNA 链结合在一起，可以促进停止的复制叉重新恢复并确保复制能高效地完成。

DNA 复制的结束过程为具有环状染色体的细菌提出了一系列的拓扑学难题：

• 首先，汇聚的复制叉将会产生一个高度的正超螺旋，需要拓扑异构酶来消除。

• 其次，完成的染色体将连接起来（连成环状），需要不同类型的拓扑异构酶共同作用。

• 第三，姐妹染色体之间的重组可导致染色体二聚体的形成，在分离前需要解开成

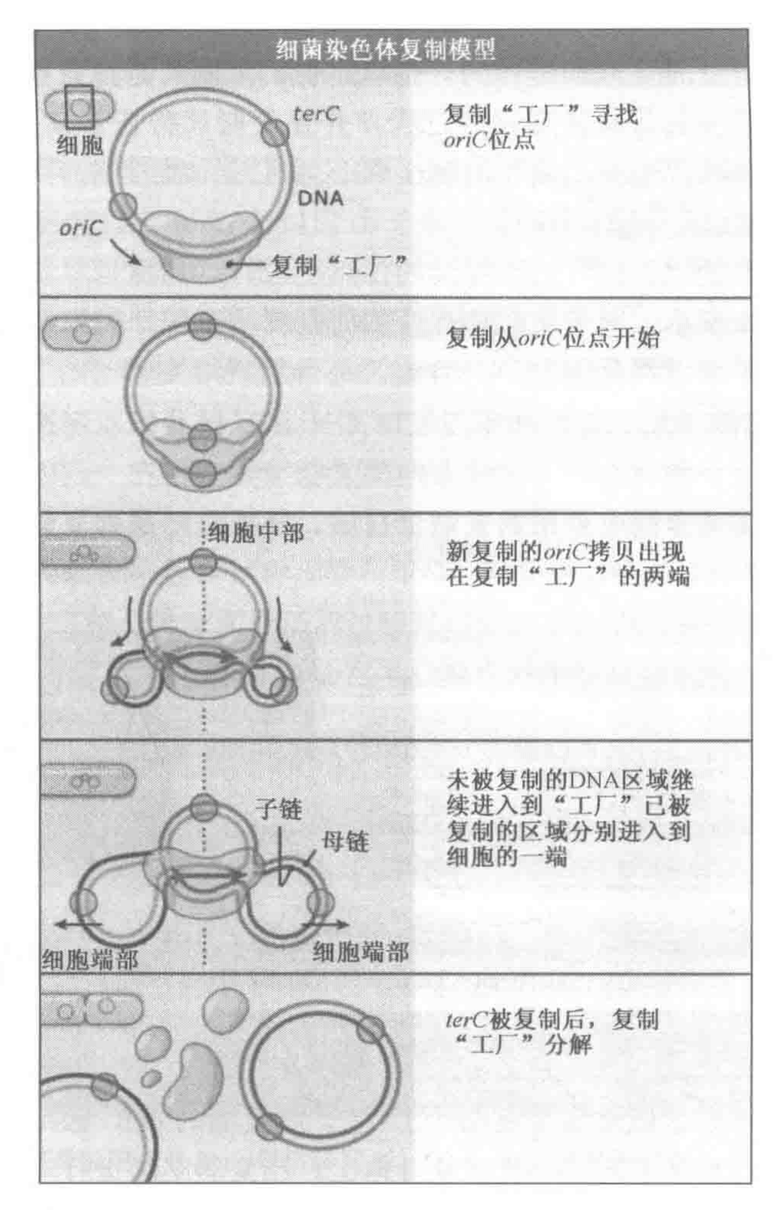


图 16.39　环状染色体的复制模型，其中两个复制叉在同一个复制“工厂”中。蓝色环表示一条 DNA 链，红色环代表其互补链；深红色环和深蓝色环代表子链。

单链。

一系列特异的细菌蛋白就可发挥不同的功能。

当一个复制叉被妨碍或延迟到达终点时，另一条链的复制将会遇到问题，因为它将一直沿着染色体臂进行复制并最终通过复制终止区到达染色体的另一半。复制终止蛋白通过封锁复制叉向错误的方向移动来控制复制的结束。最终结果是复制叉被强迫在染色体的特定区域停止，在那里细胞可以进行接下来的二聚体的解聚以及解连环作用。解连环作用很可能是由特异的拓扑异构酶 TopoⅣ实现的。二聚体的解离涉及特殊的位点特异性重组系统，包含了一个异源二聚体催化解离酶（XerCD）和一个靶位点，*dif*，位于复制终点区。当染色体二聚体形成后，两个 *dif* 位点在一起配对，接着 XerCD 切开并交换两个染色体链，最终产生两个分离的环。很明显的，这个系统有时需要分辨二聚体染色体和单链染色体，并仅仅作用在二聚体上（因为单体重组将会产生一个二聚体！）

（更多关于染色体分离的资料见MBIO：16-0014）。

在大肠杆菌中，拓扑结构的分辨是通过 FtsK 蛋白实现的，这个蛋白在细胞分裂的晚期表现多种功能。首先，FtsK 是分裂隔膜的形成所必需的［见 16.16 *原核细胞分裂涉及形成复杂的细胞动力环*（cytokinetic ring）］。其次，FtsK 具有 DNA 易位功能，如果 DNA 被形成中的隔膜滞留时，它可以把 DNA 从分裂隔膜中输送出来。这种输送活性可能帮助把染色体二聚体的两个 *dif* 位点带到一起，并且 DNA 的转移很可能是有方向性的，以有利于这种连接。第三，如果需要的话 FtsK 可以启动 XerCD 重组酶的活性，使二聚体解离，并使姐妹染色单体进入到各自的细胞中。最后，FtsK 可以与拓扑异构酶Ⅳ发生相互作用，可以使之在染色体解连环的过程中起到协同作用。

16.15 原核细胞染色体分离是在缺乏有丝分裂器的条件下进行的

关键概念

- **原核生物细胞中不存在纺锤体，但它们仍可以精确地分离染色体。**
- **对于 *oriC* 在染色体上的位置的测量结果显示，在 DNA 复制周期中，染色体可以主动分离到细胞相反的两极。**
- **对于原核生物的染色体分离机制了解很少，因为这一过程非常复杂。**
- **ParA-ParB 系统参与许多细菌染色体的分离和低拷贝数质粒的分离。**

像所有细胞一样，原核生物细胞在分裂之前需要确保它们的遗传信息已经完全经过复制，并且一对姐妹 DNA 分子被精确地分配到两个子细胞中。对于野生型细菌细胞的测量结果显示，染色体的分离是个极其有效率的过程，产生无核细胞的几率微乎其微（$<10^{-4}$ 每个细胞，每一代）。与真核细胞不同的是，原核细胞中没有明显的纺锤体来牵引复制的染色体分离。这很有可能是因为原核细胞的体积很小，所以不需要纺锤体。然而，即使在真核细胞中，复制后的着丝粒也需要在空间上先分离，然后才能到达细胞的两端，与纺锤体连接在一起。原核生物的染色体分离很有可能与真核细胞的染色体分离过程的早期是相似的，或者甚至是一样的，但真实的情况了解得很少（真核细胞的有丝分裂的细节见第 10 章*有丝分裂*）。

关于细菌染色体分离的早期模型涉及新复制的染色体通过 *oriC* 区域与细胞生长中心区的细胞外被结合在一起。细胞的伸长导致姐妹 *oriC* 区域被缓慢牵引分离，这一过程与细胞生长保持同步。但是后来的事实表明，细胞外被的生长不是以带状的方式实现的。此外，在一些情况下，染色体的分离是在距离很远的情况下发生的，例如在枯草芽孢杆菌中的芽胞形成时细胞的极分裂（见 16.17 *原核细胞通过复杂的机制对刺激发生反应*），又如在某种柄状细菌中，是通过一个延长的管子实现的。

研究细菌染色体分离过程的进程很缓慢，因为很难分离到特异影响染色体分离的突变体。大多数可能的突变体都是间接地影响染色体分离，或是通过干扰染色体的复制，或是干扰拟核的整体结构。SMC（MukB）系统是这方面的一个很好的例子。在进行无核细胞突变体的筛选时，获得了一个在 *mukB* 位点上发生突变的突变体。虽然 MukB 在分离中的直接角色尚不明了，但研究证明 MukB 与相关蛋白质的主要功能可能是维

持拟核的结构（染色体凝缩），（见图 16.35 和 16.13 细菌拟核和细胞质膜是高度有序的）。关于细菌中的染色体分离的两个问题，近年来取得了很大进展：

- 质粒分离的研究。
- 显微镜方法的应用，使我们可以直接看到染色体上特异位点在细胞周期的不同阶段的位置和运动。

存在多种机制使质粒维持稳定的状态。低拷贝数的质粒的复制是保持每个细胞中质粒的拷贝数与宿主染色体保持一致（每个细胞 1～2 个拷贝）。质粒面临着与染色体相同的问题，如解链环作用和二聚体分解。在一般情况下，为了解决这些问题，质粒会共享宿主的编码系统，比如 XerCD 重组酶（见 16.14 细菌染色体以一种特殊的复制方式进行复制）。很多质粒也编码有趣的“解毒”系统，以不同的方法解决不稳定的问题。利用这个系统，没有得到质粒拷贝的子细胞将被杀死。从根本上说，大部分的低拷贝数的质粒都拥有一个主动的，专门应对分离的机制，其主要由两个蛋白组成，通常被称为 ParA 和 ParB。ParA 蛋白具有弱的 ATP 酶活性，同时它还经常参与转录的调节作用。ParB 蛋白是 DNA 结合蛋白，结合在分离所需要的特异的顺式作用位点。ParA 可以与 ParB 发生相互作用结合在分离位点，这是分离所需要的。不幸的是，尽管研究了几乎 20 年，但是 ParA 和 ParB 稳定分离过程的机制仍不明朗（更多关于解毒系统和 ParA 与 ParB 的资料见MBIO16-0015）。

研究证明在大多数的细菌中都存在 ParA 和 ParB 的同系物，也都是染色体分离所必需的（然而有趣的是在大肠杆菌及其相近菌种中却没有!）。在枯草芽孢杆菌中，类似的同系物 Soj 和 Spo0J，分别与染色体分离和芽胞形成过程有关。尽管 *spo0 J* 突变体的染色体经常处于异常的位置，但是仍然可以正常存活，这也强调了一个观点：染色体的分离是一个复杂的过程。Spo0J 蛋白结合在 *oriC* 附近的大约 800Kbp 的区域内的一系列特定的位点上。如图 16.40（见图版）所示，结合上的蛋白被浓缩成紧密的“点”，可以通过荧光显微镜看到，并且这个浓缩过程需要 Soj 蛋白的存在。相对于质粒中的 ParAB 系统，Soj 和 Spo0J 是怎样促进染色体分离的仍然了解得不清楚。然而，对于 Spo0J 聚集点的观测，揭示了在一轮 DNA 复制完成后不久 *oriC* 区就主动分离。Spo0J 聚集点将很快占据复制中的拟核的另一端。应用其他方法观测 *oriC* 区，也得到了类似的结论。然而，至少有一个研究指出聚集点的移动是缓慢的，也许这个结论暗示了分离是被动的。目前为止，还没有清晰地描绘出 ParAB 蛋白是怎样帮助确保染色体正确的分离，并且事实上在缺失这个系统的情况下，会快速启动 *oriC* 区的分离。有一种观点认为，当 DNA 从复制体挤出后，可以提供分离所需的驱动力。然而这种机制会与另一种观点出现不一致，这种观点主张利用姐妹染色单体修复作为染色体连续复制过程的机制（见 16.14 细菌染色体以一种特殊的复制方式进行复制）（更多关于 Soj 和 Spo0J 的资料见MBIO：16-0016）。在一些种类的细菌中，MreB 蛋白（肌动蛋白）可能涉及染色体的主动分离；这是未来研究的一个重要领域。

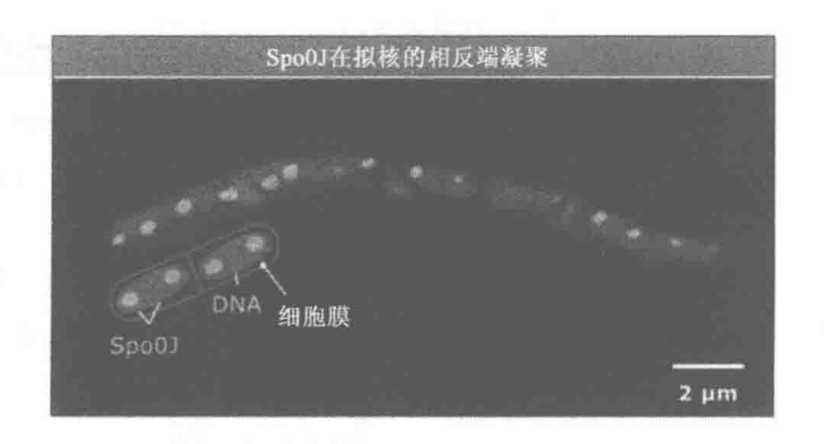


图 16.40 在枯草芽孢杆菌中，Spo0J 蛋白在染色体 oriC 区形成紧密的焦点。蓝色的是 DNA（DAPI 染色），红色的代表的是细胞质膜（FM5-95 染色），绿色的是 Spo0J（实际是 Spo0J 和绿色荧光蛋白组成的融合体）。小图部分是细胞结构示意图，可以看出 oriC/Spo0J 复合体形成的凝聚体位于拟核的外层边缘。照片由 Oxford 大学的 Alison Hunt 惠赠。

16.16 原核细胞分裂涉及形成复杂的细胞动力环（cytokinetic ring）

关键概念

- 在细胞分裂的最后阶段，细胞外被产生缢痕并分裂或者合成隔膜，紧接着自我分解，形成两个独立的细胞。
- 微管蛋白同系物，FtsZ，通过在分裂位点形成一个环形结构，组织细菌中的分裂过程。
- 大约八种重要的分裂蛋白在分裂位点与 FtsZ 一起聚集。
- 两个负调控系统决定细胞分裂位点：拟核封闭（nucleoid occlusion）和 Min 系统。

大部分的原核生物细胞精确地在细胞中部分裂产生两个一样的子细胞。DNA 的复制和分离与细胞分裂紧密联系（见 MBIO：16-0017，MBIO：16-0018 和 MBIO：16-0019）。细胞分裂通常发生在细胞生长，内溶物加倍之后。当染色体分离后，细胞进行细胞质分裂，通过这个过程，细胞内的物质被分到两个细胞内。细胞质分裂包括所有的细胞外被膜层的环状内向运动。如图 16.41 所示，细胞质分裂可以通过两种不同的方式发生。在一些生物体，如革兰氏阴性大肠杆菌中，分裂是通过细胞外被形成缢痕后分开实现的。在另一些细菌，如革兰氏阳性枯草芽孢杆菌中，一个环形的细胞壁物质向内生长，形成一个隔膜。当隔膜形成后，在生理学上，双层膜的形成把细胞分成两个子细胞，但仍然连在一起。细胞的分离是个明显的过程，是通过隔膜的自我分裂实现的。由于生长环境的影响，隔膜的分裂有可能会发生得很慢，其结果可能形成一长串首尾相连的细胞。

通过对 *fts*（丝状温度敏感，filamentous temperature-sensitive）突变的分离与鉴定，发现了一系列与分裂相关的基因。*fts* 突变体细胞在非允许的温度范围生长时形成不分裂的丝状体。在大多数的细菌中存在大约 8 个 *fts* 基因。一个具有开创性的发现是由 Lutkenhaus 观测到的，FtsZ 蛋白在分裂位点的细胞质膜内侧形成了一个环状的结构。其余的分裂蛋白依次组装到“Z 环”，其顺序如图 16.42 所示的大肠杆菌中的情况。这其中的大部分蛋白的功能都不清楚。

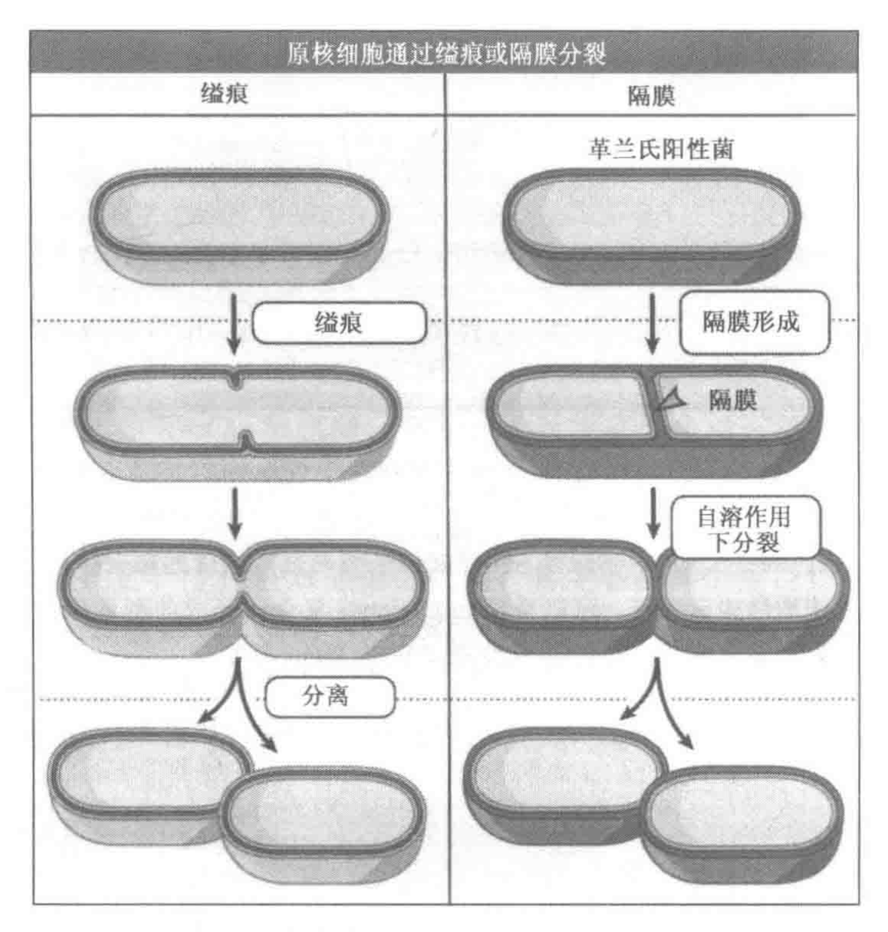


图 16.41　对原核生物来说，细胞质的分裂是通过缢痕或隔膜发生的。为了简洁，菌体的荚膜层未显示。

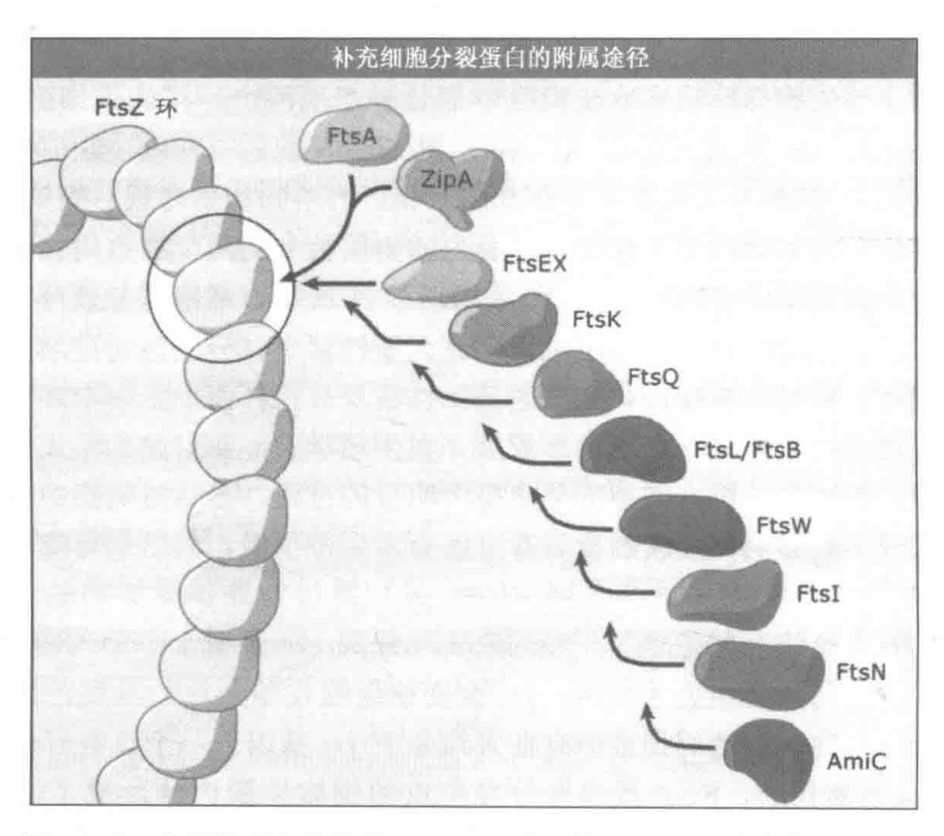


图 16.42　大肠杆菌中细胞分裂蛋白及其组装途径。运用遗传学技术确定 FtsZ 蛋白呈环状，其他蛋白在旁边顺序排列。

FtsZ 是细胞分裂的关键蛋白，与真核细胞中的微管蛋白（细胞骨架蛋白可形成微管）具有同源性。类似于微管蛋白，FtsZ 是一个 GTP 酶，并且在体外当有 GTP 存在时，将聚合成为线状的原丝，进而组装成束状和片状。FtsZ 环在体内是作为一个动力学结构出现的，它处于不停的变化中（半衰期小于 10s）。这也暗示了微管蛋白在真核细胞中的行为特点（见第 7 章微管）。

FtsA 蛋白可以直接与 FtsZ 相互作用，并与 Z 环组装在一起，预测其功能是有助于环的稳定。FtsA 与真核生物的肌动蛋白有紧密的联系，但多了一个未知功能的结构域。FtsA 只出现二聚体的形式而没有多聚体。尽管 FtsA 不是形成 Z 环所必需的蛋白，但 FtsA 和 ZipA 双突变缺失突变体却不能形成 Z 环。因此，FtsA 和 ZipA 在部分功能上是相似的，至少 Z 环的稳定需要它们中的一个。ZipA 也表现出可以直接与 FtsZ 作用，但是不同于 FtsZ 和 FtsA 的是它是一个跨膜蛋白。因此，ZipA 可能把 Z 环耦联在细胞质膜上。

其余的细胞分裂蛋白都是跨膜蛋白。FtsL 和 FtsQ 的具体功能至今未知。FtsW 很可能为 FtsI 提供前体，FtsI 是一种酶，在隔膜形成中起作用。FtsI 是个特殊的青霉素结合蛋白，与普通的细胞壁合成复合体相互作用，在细胞分裂过程中合成新的细胞壁（细胞合成的细节见 16.6 细菌细胞壁含网状结构的肽聚糖）。在大肠杆菌中，FtsK 和 FtsN 是细胞分裂所必需的，但在枯草芽孢杆菌中，FtsK 的同源物（SpoⅢE）并不是细胞分裂必需的，并且没有 FtsN 的同源物。

在研究得比较详细的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中，分裂蛋白的组装途径有些很有趣的不同之处。在大肠杆菌中，分裂蛋白依次组装在一起成线状（见图 16.42），而在枯草芽孢杆菌中，组装 Z 环的分裂蛋白之间存在广泛的相互依赖。这种不同可能反映了革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌之间细胞外被结构及组成是不同的。到目前为止，关于完整的分裂组装复合体是怎样影响细胞质分裂的信息仍然很少，这也是未来研究的重要领域。

控制细胞分裂的主要因素是 FtsZ 环的形成水平。被称为拟核封闭和 Min 系统的两个系统被认为是控制细胞分裂位点的位置以及时间的关键。这两个系统确保分裂发生在 DNA 完整复制之后以及产生的子细胞是均等大小的。

对拟核封闭系统的理解很少，拟核体积明显增大可防止分裂的发生（图 16.43）。只有当 DNA 复制完成以及姐妹染色体分离并形成独立的拟核时，分裂才开始在细胞的中部发生。当复制或分离被阻断或不对等时，拟核将出现在细胞的中部以阻止隔膜的出现。大体上说，拟核的负效应可能是由 FtsZ 从拟核中被去除而造成的，因此阻止了 FtsZ 的积聚，使之达不到发生聚合作用所需的临界浓度。

依赖细胞拟核封闭效应出现了一个潜在的问题，在细胞的两极（至少对于杆菌细胞）没有被拟核所保护，容易出现异常的极分裂。为了解决这个问题，很多细菌产生多种蛋白质组成 Min 系统，来阻止细胞的端部分裂。这个系统的名字来源于 mini-细胞（mini-cell），这种细胞的 *min* 基因发生了突变，在其端部会发生不正常的分裂。

Min 系统的关键作用因子是一个叫做 MinC 的细胞分裂抑制蛋白。这个蛋白可以阻止 Z 环的形成，很有可能可以直接解聚 FtsZ 的聚合物。MinC 的活性受 MinD 蛋白的调

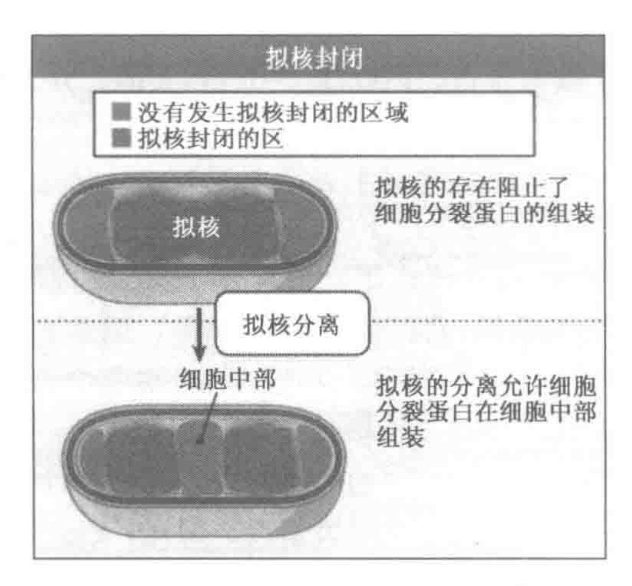


图 16.43　拟核封闭对细胞分裂的空间负调控。

节。MinD 很可能是通过控制 MinC 在细胞中的位置而达到此目的的，并很可能产生两个截然不同的影响。第一个是 MinD 把 MinC 带到细胞质膜的附近，那里是 FtsZ 环组装的地方。第二个是 MinD 把 MinC 限制在细胞端部，阻止端部分裂。

许多棒状细菌利用 MinCD 系统控制细胞的分裂位点。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的 MinCD 系统具有典型的特点。然而，这两种菌中的 MinD 限制 MinC 在细胞端部的活性的机制具有显著的不同之处。枯草芽孢杆菌的机制比较简单，其中有个端部锚定蛋白，叫做 DivⅣA，把 MinCD 复合体吸引到细胞的端部，并在细胞周期中使之保持静止的状态。如图 16.44 所示，在新生细胞中，DivⅣA 和 MinD 定位于细胞的端部，因此 MinC 的存在阻止了 FtsZ 环在细胞端部形成。推测在 DNA 复制完成之后，一个新的分裂位点将出现在细胞的中部。由于 MinC 被隔离在细胞端部，因此使得 FtsZ 环可以在细胞中部组装并有其余的细胞分裂蛋白加入进来。在这一点上，推测分裂复合体对 MinC 的抑制作用产生抗性。DivⅣA 和 MinD 蛋白接着出现在细胞的中部。因此，当分裂形成两个新的细胞端部后，DivⅣA 蛋白将出现在这里，并直接建立一个 MinCD 抑制区。当缢痕形成后，FtsZ 环发生解体，但是 DivⅣA 和 MinD 仍然留在新形成的端部，以阻止在这些端部发生细胞分裂。因此，这种机制的重要特征是 DivⅣA 对分裂位点的靶向作用和停留在细胞的端部。然而，当 DivⅣA 在真核细胞（裂殖酵母）中表达后，会定位在分裂位点。这种混乱揭示了 DivⅣA 辨别的是一种拓扑结构的改变，如细胞质膜弯曲，而不是某种特殊的蛋白目标。

相反的，大肠杆菌具有动态的 MinCD 系统，仅出现在细胞的一端，并且只持续很短暂的时间。紧接着，复合体解体，然后在细胞的另一端出现，从而以这种方式在细胞两端交替出现。这种交替的方式受 MinE 蛋白环驱动，MinE 蛋白环从细胞的一端到另一端来回运动，在其间驱动 MinCD 复合体离开一端，并在另一端重新组装。MinD 的位置从一端到另一端的转变时间间隔只有十几秒。如图 16.44 所示，MinD 在 MinE 环存在的相反的一端交替地积累。MinD 位置的快速转换确保 FtsZ 环不能在细胞端部形成。MinE 在细胞中部广泛存在，阻止了 MinD 在此区域的抑制活性，从而允许 FtsZ 环在此形成。让人感到不明了的是，大肠杆菌为什么选择这么消耗能量的机制来控制

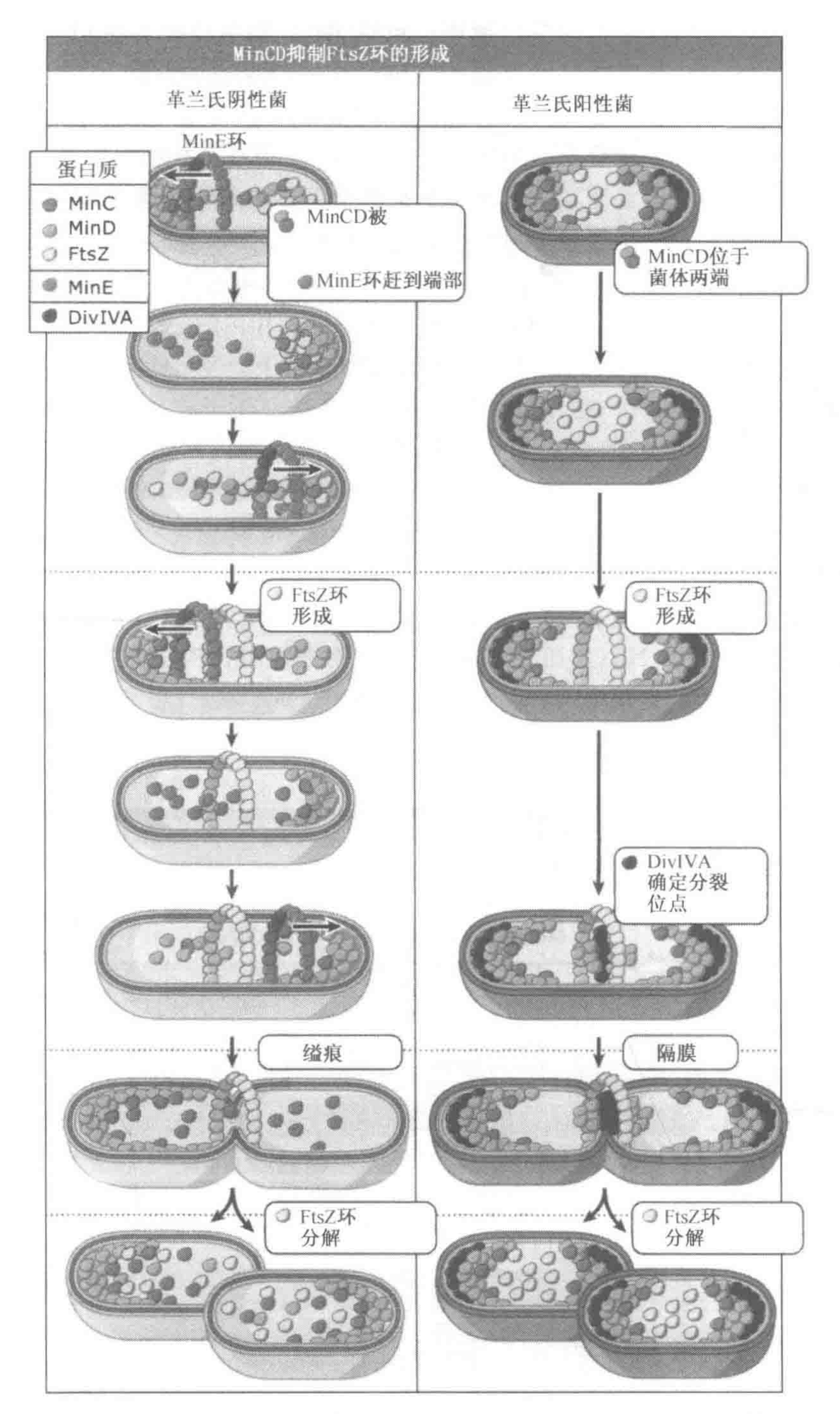


图 16.44　上图显示了细胞周期的不同阶段，决定细胞分裂位点的关键蛋白质所处的位置。开始于新产生的细胞，结束于产生两个子细胞。上图显示了每个细胞的横截面视图，但显示了完整的 FtsE 环和 MinE 环。为了简洁，未显示拟核。

MinCD 和确定细胞端部。

MinD 属于一个很有意思的蛋白家族，包括 ParA 染色体分割蛋白（chromosome partitioning protein），具有结合核苷酸的功能（见MBIO：16-0020）。类似于 ParA 的 Soj 蛋白也表现出动力运动性。这类蛋白的运动功能很有可能是通过结合核苷酸来实现的，并通过水解作用控制聚合反应和解聚反应，而不是像在真核细胞中通过控制肌动蛋白丝和微管的动态不稳定性来实现（见第 8 章肌动蛋白和第 7 章微管）。因此这一类蛋白可能构成了细菌细胞骨架蛋白的另一个类别并具有广泛的功能，特别是在细胞周期中的形态发生方面具有功能。

最近发现了在革兰氏阳性菌中的拟核封闭作用中起作用的一个蛋白。Noc 相对来说是一个非序列特异性的 DNA 结合蛋白，并定位在拟核中。Noc 同样可以抑制细胞的分裂。*noc* 突变体在染色体不对称地复制后不能正常生长。在 *noc*⁻ 细胞中，直接把拟核分裂成两部分，但在野生型的细胞中，这种情况不会发生。如图 16.45 所示，Noc 与 MinCD 系统协同工作促使 FtsZ 环在细胞中部形成。在野生型细胞中，DivⅣA 把散布于细胞质膜各处的 MinD 聚集起来以完成聚合。MinC 和 MinD 一同阻止 FtsZ 在细胞端部的集聚和聚合。也有人提出，Noc 联合拟核一起抑制 FtsZ 在拟核附近的集聚和活性。在细胞中，Min 系统阻止了 FtsZ 环在细胞中部以外的地方组装，并且细胞生长正常。然而，在 *min*⁻ 细胞中，Noc 仅阻止 FtsZ 在拟核附近组装，FtsZ 可以在细胞中部和无拟核的细胞端部组装。在缺少两种拓扑结构抑制物（*min*⁻ *noc*⁻ 双突变体）时，FtsZ 的组装是不受限制的，呈多片状遍布整个细胞。这些片状的 FtsZ 是没有活性的，导致

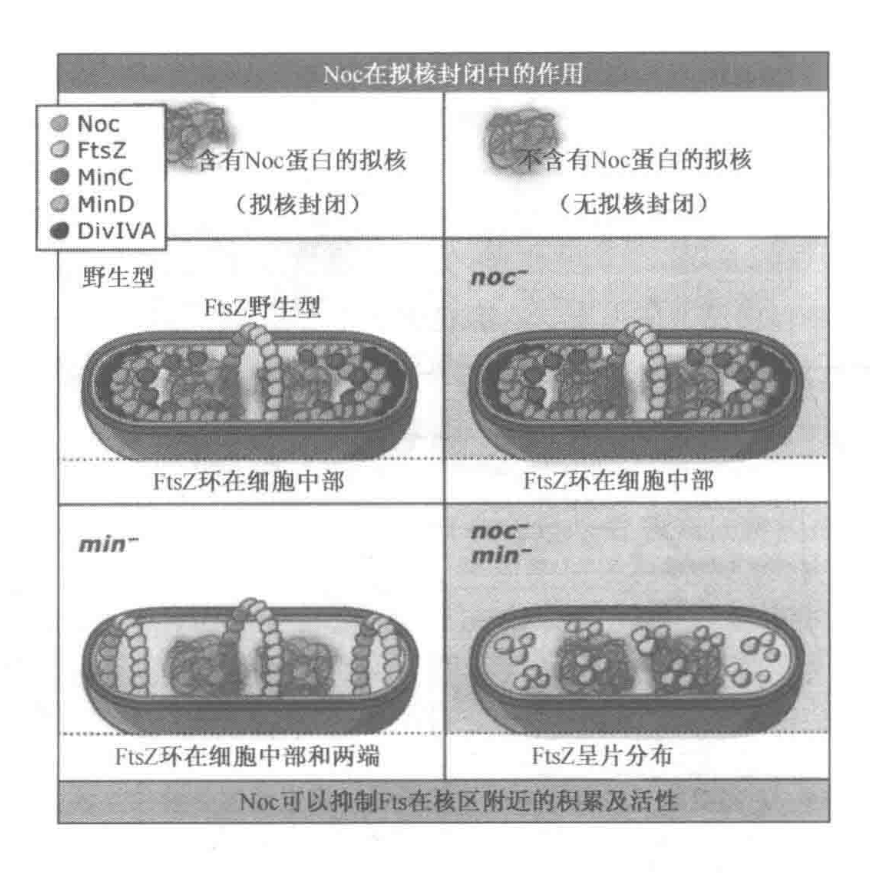


图 16.45　在革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌中，细胞分裂的拓扑结构控制模型。

细胞分裂能力的丧失。革兰氏阴性菌中不存在 Noc 蛋白，但在大肠杆菌中发现了一种与 Noc 类似的可以控制拟核封闭作用的蛋白。

16.17 原核细胞通过复杂的机制对刺激发生反应

关键概念

- 对于环境压力如营养缺乏，原核生物将启动大范围的适应性改变。
- 对于饥饿压力，微生物最简单的适应性是改变基因的表达和改变新陈代谢，并减慢细胞周期。
- 在一些实例中，饥饿介导高度分化的细胞类型的形成，比如枯草芽孢杆菌中的芽孢。
- 在饥饿期间，菌丝体状有机体如放线菌，拥有复杂的菌落形态，并产生气生菌丝、孢子和次级代谢产物。
- 黄色黏球菌表现出多细胞合作并作为一个整体发育。

很多原核生物种群在营养丰富的环境中都会进入快速生长的时期，但在某些情况下会被打断，而进入停滞期或衰亡期，如当营养物被耗尽时或有毒性的代谢产物积聚时。在一些实例中，原核生物对饥饿或营养物质缺乏时的反应仅仅是简单地重新调整一下相关的代谢过程。这些调整有部分是通过改变基因表达而实现的，从而可以把能源用在基本的生存需要上而不是生长需要。在另外一些实例中，它们会启动复杂的分化过程，从而分化出两种或更多的明显不同的细胞类型。

例如，在大肠杆菌中，当进入稳定期时会导致在基因表达上的很多变化。在一种情况下，这种变化针对某特别代谢过程的刺激和依赖于饥饿刺激而发生的反应。这种反应允许某一阶段菌体生长速度的降低。然而当所有营养物质都被消耗殆尽时，细胞会启动整体性的应对饥饿的反应，这种反应主要由专门的 σ^S 因子（sigma factor）介导。σ^S 因子是由 *rpoS* 基因编码的 RNA 聚合酶亚基。如图 16.46 所示，σ^S 因子受到一系列复杂的调节因素的影响，进而在转录水平、翻译水平、后翻译水平发挥作用。细胞内的 σ^S 总量的增多是通过两种可能的方式实现的：一种是刺激 σ^S 的合成，这种是通过刺激 rpoS 的转录和 rpoS mRNA 的翻译而实现的；另一种是防止 σ^S 的水解（在正常情况下，蛋白水解是格外迅速的）。在一些因素的联合刺激下会启动迅速而强烈的反应，如当高渗透压和 pH 改变时。当一系列的特殊的生理刺激出现时，这种复杂的调节机制会发生一个共同的反应。

σ^S 可以控制大量的基因。图 16.47 列出了了解得比较清楚的基因，以及它们在适应非生长环境中的可能的功能。稳定期反应的最后结果是出现可以抵抗环境刺激的休眠细胞，而这些刺激会很迅速地杀死生长中的细胞。

与大肠杆菌不同的是，在枯草芽孢杆菌中对于饥饿压力的最终反应结果是芽孢形成（sporulation），在这个过程中将形成一个芽孢（一种休眠细胞），如图 16.48 所示。在枯草芽孢杆菌中，芽孢由一个内生孢子在菌体内部发育而成。芽胞形成过程开始于菌体营养生长期（vegetative phase growth），并在细胞内外多种因子共同作用下，以及几十个调节基因的共同控制下而形成。芽孢形成的关键正调节蛋白是 σ^H 因子（sigma factor σ^H）以及反应调节子 Spo0A。Spo0A 通过磷酸化被激活，因此把磷酸基转移到 Spo0A 上的过程是关键的控制点，在此包括至少两种激酶，两种中间磷酸载体，以及三种或更

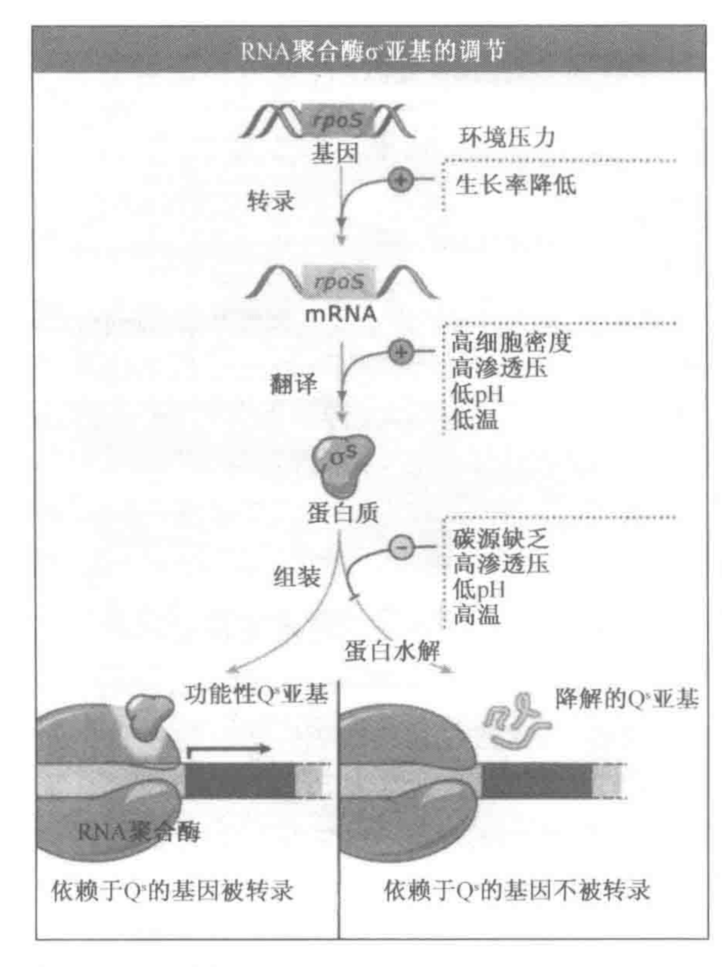


图 16.46　不同的环境压力对 σ^s 不同水平的调节。

多的磷酸酶，所有这些物质都涉及促进或阻止芽胞形成作用（这些因素的功能见 MBIO：16-0021）。除了正调节外，存在大量的转录阻遏物可以减少转录复合体的关键元件的表达。

大肠杆菌中处于 σ^s 亚基控制下的一些平稳期基因	
基因	蛋白功能（已知或可能）
csgA，*csgB*	与附着作用和形成生物膜有关的细胞外纤维状结构（curli 菌毛）的组成成分
dacC	羧肽酶：催化形成可稳定肽聚糖的交联剂
dps	DNA 结合蛋白包括调节基因表达和保护 DNA 免遭破坏的蛋白
emrA，*emrB*	多重耐药泵（细胞膜蛋白，可以把一些药物排出细胞）
ftsA，*ftsQ*，*ftsZ*	细胞分裂蛋白：在生长停滞后允许稳定期的细胞分裂，从而最终形成遗传物质均一化和小型化的细胞
glgS	与糖原的合成有关（葡萄糖的储存形式）
katG	过氧化氢酶-过氧化物酶：催化 H_2O_2 分解
otsA，*otsB*	海藻糖的合成，海藻糖与渗透压保护和稳定期的耐热性有关
proU	细胞膜蛋白（可把脯氨酸甜菜碱和甘氨酸甜菜碱转运到细胞内，从而对细胞进行渗透压保护）

图 16.47　大肠杆菌中依赖于 σ^s 的基因。

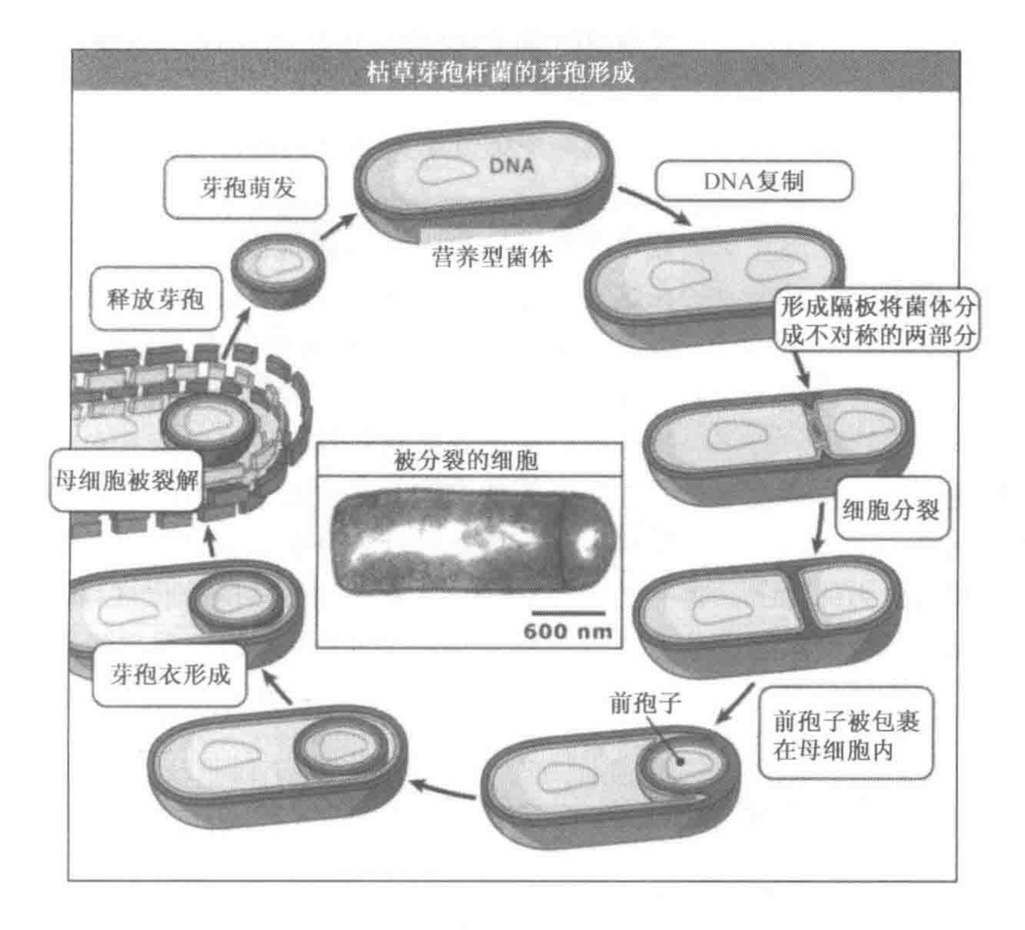


图 16.48　枯草芽孢杆菌的芽孢形成涉及形成前孢子，前孢子被母细胞包裹。当芽孢衣形成后，母细胞被裂解，释放出成熟的芽孢。图中的电子显微照片显示的是在形成芽孢的过程中的母细胞被分成不对称的两部分。照片由 Oxford 大学的 Jeff Errington 惠赠。复制自 Errington，J.，Murray，H.，and Wu，L. J. Diversity and Redundancy… *Phi. Trans. R. Soc.* 2005. 360：pp. 497-505。

这个复杂的调节系统的信号至少有三种。首先，因为大部分的信号分子都与营养有关，因此细胞内的 GTP 水平是关键的指示信号，GTP 结合蛋白 CodY 在这个调节系统中起关键作用。第二，细胞可以通过群体感应系统（quorum sensing system）检测种群密度的大小，应用这个系统可以监测分泌多肽在细胞内的积累（群体感应的细节见 16.21 *生物膜是高度有组织的生物群落*）。仅仅当种群密度很高并且肽的浓度达到很高水平时才会启动芽胞形成。第三是细胞周期，因为细胞周期对于芽胞形成来说是至关重要的，仅仅只有当在某一特殊时刻的时候才能启动芽孢的形成。否则只会进入下一轮正常细胞分裂。另外还存在多个“检查点”检查染色体的复制和分离，一旦有错就会阻止芽孢的形成。

细胞一旦进入芽孢形成程序将导致细胞进行不对称的分裂（见图 16.48）。控制不对称分裂的开关受 FtsZ 的浓度增加的驱动，同时受合成芽孢形成特异蛋白 SpoⅡE 的控制，但这个蛋白质怎样精确控制芽孢形成转换的开关还不清楚。这是芽孢形成过程中的关键一点，因为其形成了两个完全不同的细胞类型，并一起促进了芽孢的形成。那个小的前孢子将变为成熟的内生芽孢。而大一点的母细胞将耗尽所有的能量来促进芽孢的成熟。这种合作方式是细菌成功形成芽孢的诀窍，因为芽孢比通过“自利”的方式产生的特化细胞更坚韧并具有更强的抵抗力。抵抗力是几种因素共同作用的结果，这些因素

包括：脱水作用、芽孢核心的矿化作用、外部保护层皮层的形成（修饰过的细胞壁），以及蛋白质性质的芽孢衣的形成。

出现在枯草芽孢杆菌前孢子和母细胞中的复杂的基因表达调控已经被人们很好地研究了，细节见MBIO：16-0022。

另一个革兰氏阳性菌天蓝色链霉菌具有更复杂的饥饿反应。这种生物属于放线菌，具有丝状和分枝状的生长模式，在这一点上更像丝状真菌。与自由生活的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌相比，营养物质缺乏几乎是菌丝不停生长形成网状基质菌丝体后的必然结果。如图 16.49 所示，菌落的形成开始于菌丝体的形成，并布满整个生长介质（土壤）的表面。处于饥饿状态的菌落的边缘部位的菌丝依然在茁壮成长。天蓝色链霉菌的饥饿反应包括特化的气生菌丝的形成，它从菌落的表面直立而出。尽管基质菌丝体的菌丝仅具有少量的隔膜，但可以戏剧化地调控气生菌丝的细胞分裂，生成大量单核的细胞，进而分化成具有抵抗力的孢子。再一次的，启动气生菌丝和孢子的分化过程将涉及一系列复杂的调节因子（其复杂程度甚至超过枯草芽孢杆菌）。从长远来看放线菌的生活周期是很重要的，因为菌丝的营养生长为饥饿状态时的反应准备了大量重要的次级代谢产物。特别的是，它们产生很多种抗生素，可在土壤中抑制细菌的生长。

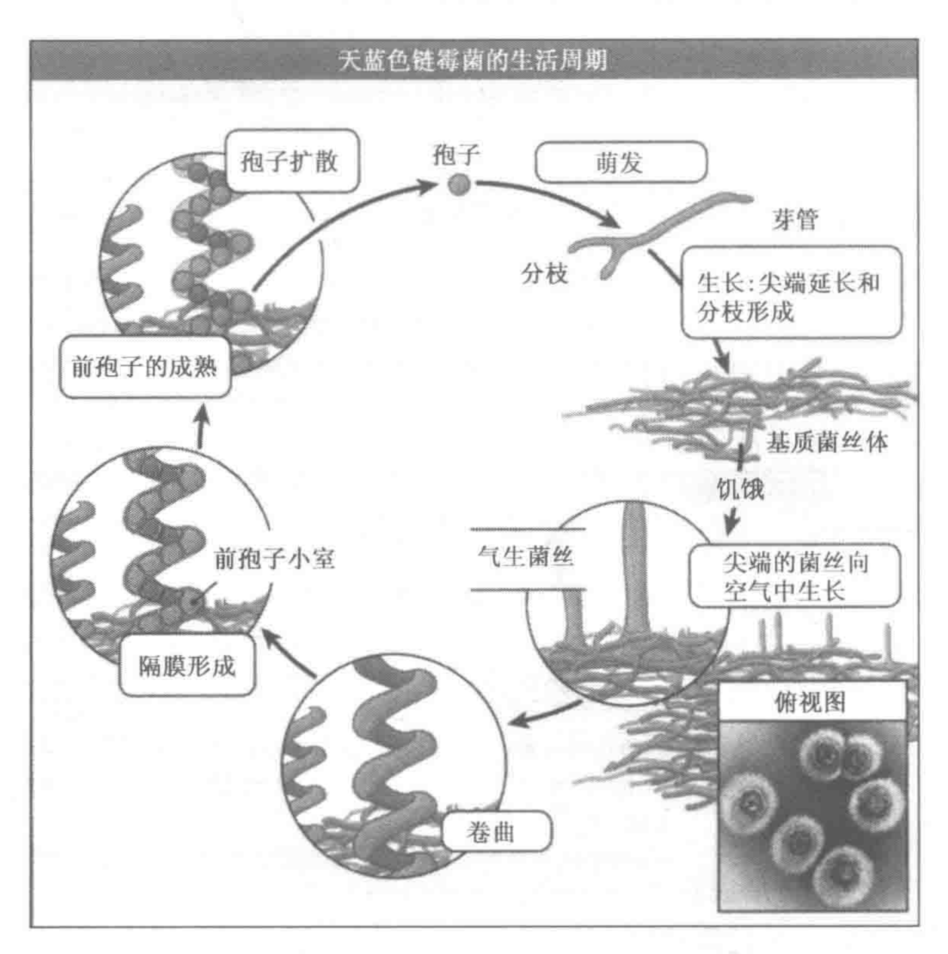


图 16.49　天蓝色链霉菌生命周期示意图。饥饿信号引起了气生菌丝的生长，由此产生孢子。照片由 John Innes 中心的 Keith Chater 惠赠。

另一种最戏剧化的细菌发育系统的例子是黏细菌。这类细菌中被研究得较为详细的是黄色黏球菌。如图 16.50 和图 16.51 所示，即将到来的饥饿引发了细胞个体聚集在一起，形成聚集体。大量的细胞被吸引进这种聚集体，这种小的聚集体又不断地堆起来，

最终形成一个大的貌似小山的隆起物。这个隆起物变成子实体，接着出现棒状细胞并分化成休眠的并可抵抗干燥的黏孢子。一些黏细菌如标桩菌属，可形成复杂结构的子实体，具有分支的梗，并在上面长着多个小孢子囊。

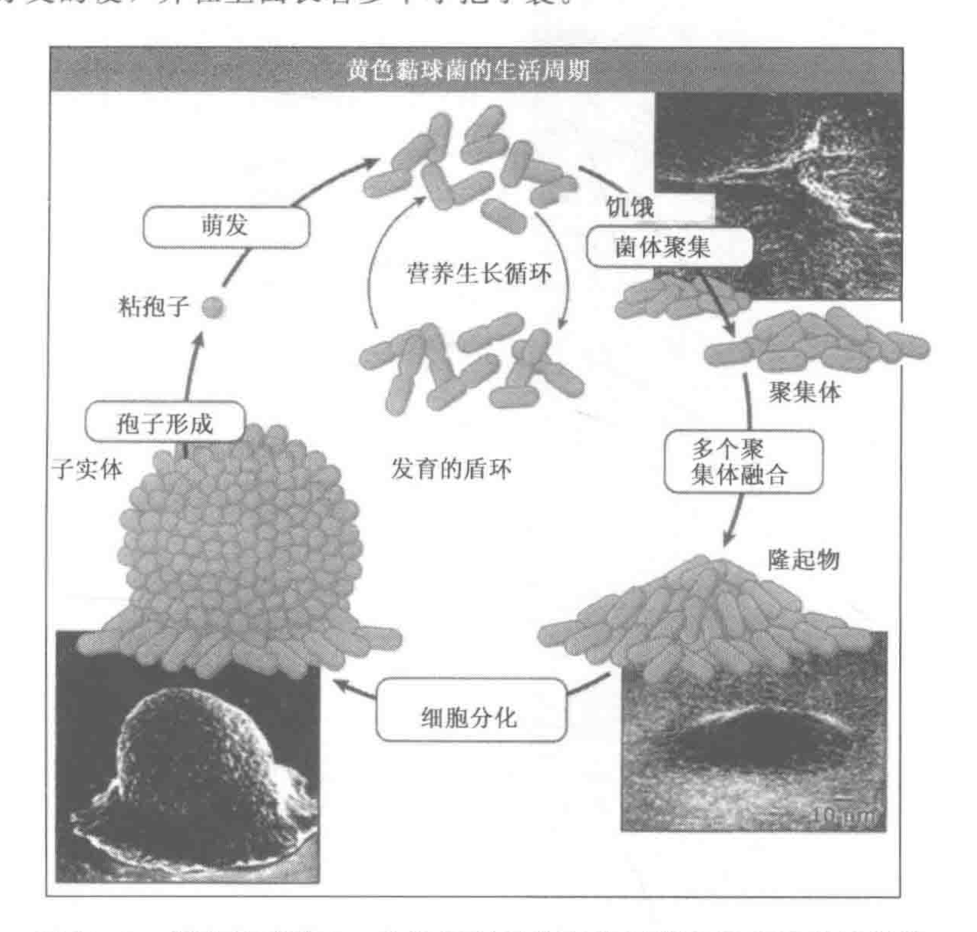


图 16.50　黄色黏球菌中，由饥饿引起的菌体细胞聚集并形成子实体，进而产生孢子。图中照片显示了饥饿 7，12 和 72h 后的细胞形态。照片由 Kuner，J. M.，and Kaiser，D. J. *Bacteriol.* 151：458-461. © 1982 ASM 惠赠。

就像在枯草芽孢杆菌中一样，大量的与黄色黏球菌的生长发育有关的基因已经被鉴定出来。把其作为研究材料的主要原因是它的信号传递是在细胞之间完成的。在发育的多个步骤中，细胞间信号的交换促进了聚集体的形成和子实体的形态发生。经过对突变体在细胞间信号传递中的影响的遗传学分析，发现了其中的两个系统，被命名为“A”和“C”。当细胞中存在一系列复杂的氨基酸时，A 信号在一种或多种细胞结合的蛋白酶的作用下产生，并在早期起作用。A 信号很有可能被用来评价种群中的一般营养物质的含量。其中的控制信号产生和感应的分子机制见图 16.52。C 信号在晚期起作用，如图 16.53 所示，紧密相连的发射信号的细胞之间的信号需求是完全不同的。C 信号是一个分子质量为 25KDa 的细胞表面结合蛋白，与短链的酒精脱氢酶家族相似。它的酶活性作用还不是很清楚。明显的，此信号的传递只能在细胞的顶端相连时才能进行，因此细胞需要调整彼此的位置以利于正确的连接。这种信号的分子细节仍然未明，但这其中有很多关于多细胞发育的问题，引起人们的兴趣。

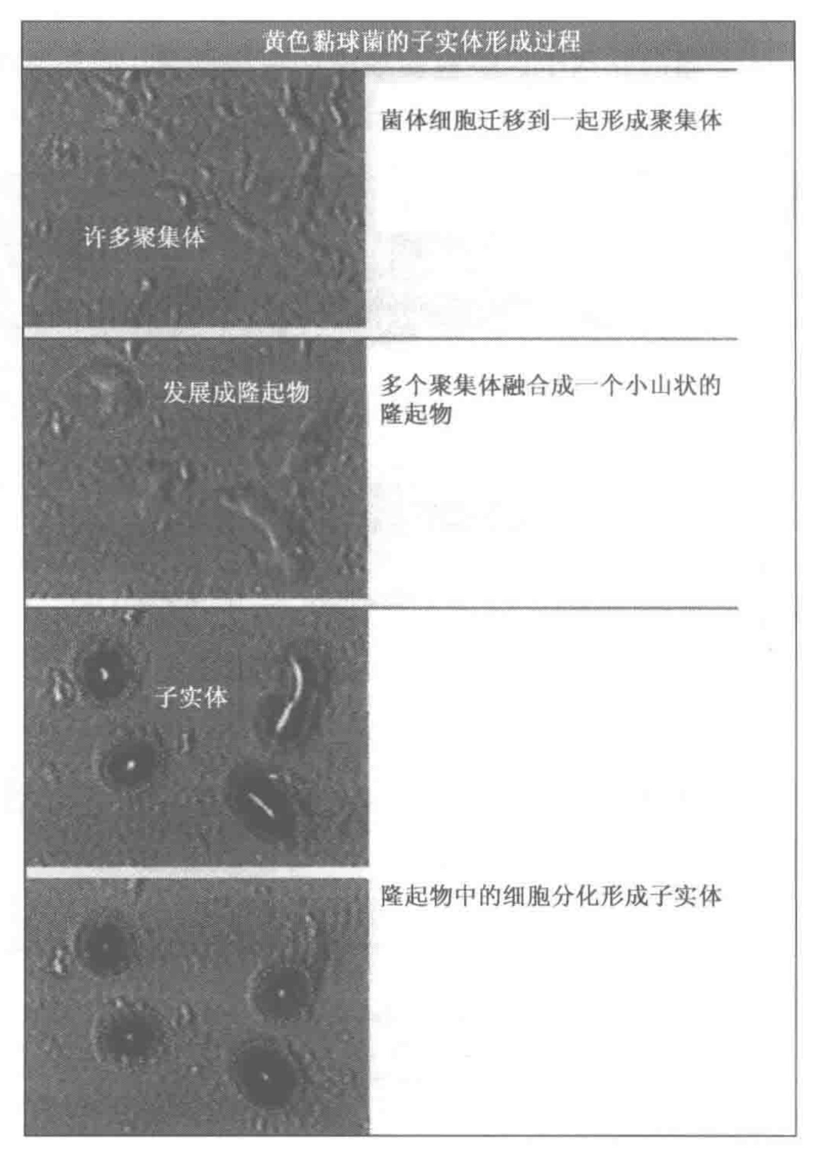


图 16.51　来自视频的镜头画面，反映黄色黏球菌的子实体形成过程，视频是从培养皿上方拍摄的（～3000×正常时间）。在营养缺乏的培养基上，菌体细胞不断地聚集成一个隆起，然后再分化，最终形成子实体。照片由 Dale Kaiser 惠赠，Roy Welch 拍摄（http：//cmgm. stanford. edu/devbio/kaiserlab/movies/development. mov）。

16.18　一些原核生物生命周期的发育改变是必然的

关键概念

- **很多微生物因为结构简单和易于处理，被用来作为研究细胞发育和分化的材料。**
- **新月柄杆菌在每次细胞分裂时都会产生特殊的细胞类型。**

许多类型的细菌被用作研究发育过程的材料，因为它们具有易于操作的实验特性。新月柄杆菌通常生活在水环境中，是最简单的、被研究得最为详细的、易于操作的生物之一。新月柄杆菌可产生两种十分不同的细胞类型（茎细胞和游动细胞）。茎细胞有一个特殊的端生茎，其有两种功能：作为固定的“锚”和通过增加与营养物质接触的表面积，可以更好地摄取营养。游动细胞可以游动，因此利于微生物的扩散。如图 16.54 所

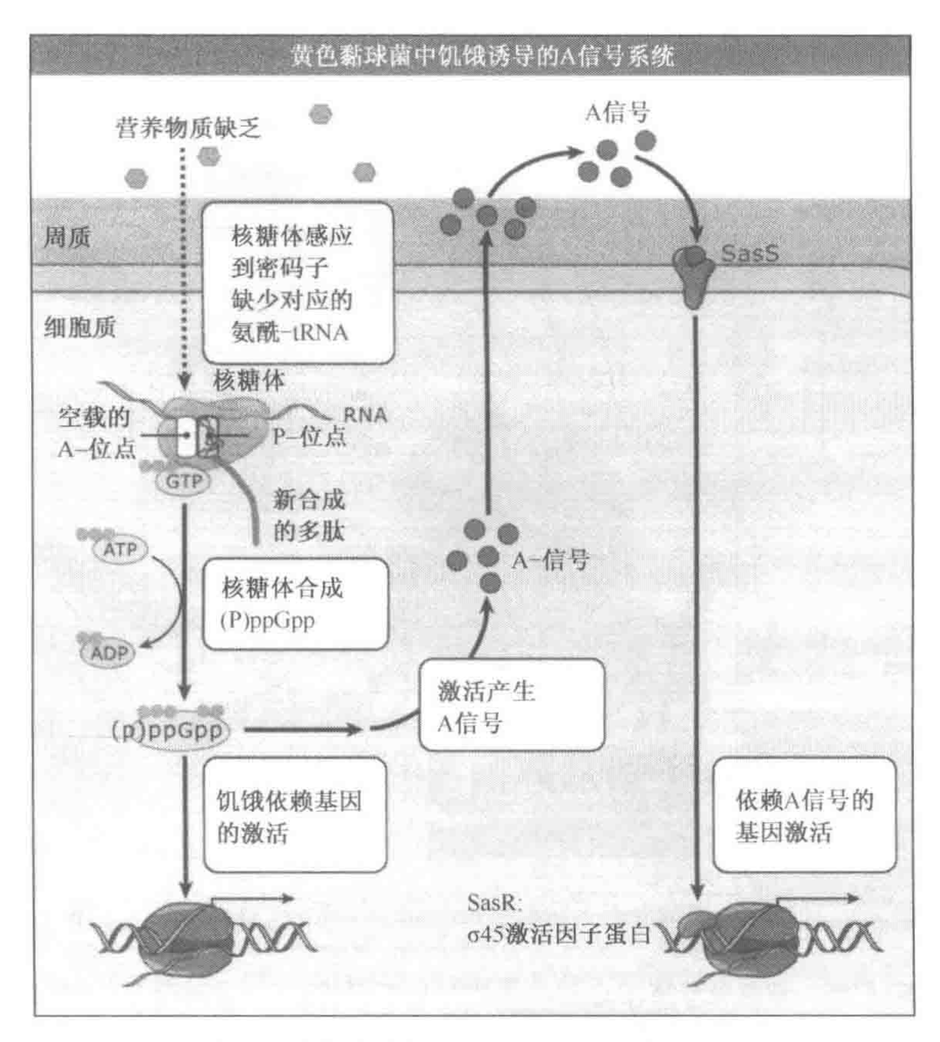


图 16.52 总结黄色黏球菌的聚集和子实体形成过程中 A 信号系统的过程。

示，新月柄杆菌的生活周期开始于能运动的游动细胞。这种细胞处于细胞周期停滞状态，类似于某种真核细胞的 G_0 期，在此期间它通过单端生的鞭毛游动离开其产生的地方（见 16.11 菌毛和鞭毛是大多数原核生物表面附属物）（真核细胞周期的细节见第 11 章细胞周期调控）。后来，它脱去鞭毛，长出一个茎，它是由胞质溶胶和细胞外膜层共同延伸而成的。茎的作用是作为这个第二阶段细胞的支架，并可能增加了细胞吸收营养物质的表面积。从游动细胞到茎细胞也暗示着细胞分裂周期的开始，并伴随着 DNA 的复制。当细胞分裂时，细胞新的一端（即无茎的一端）开始分化，非常明显地组装出一个新的鞭毛。细胞分裂产生一个游动细胞和一个茎细胞。游动细胞有根能动的鞭毛可以使菌体游到其他地方，这是一个继续扩散的过程。茎细胞分化自游动细胞，可以立即启动细胞周期和开始 DNA 复制。

新月柄杆菌中，细胞的分化和细胞周期过程是紧密联系的。例如，用抑制 DNA 复制的试剂处理细胞后，鞭毛不再形成。细胞周期是被一系列的调节因子所控制的，其中起到关键作用的是反应调节蛋白 CtrA。类似于枯草芽孢杆菌中的 Spo0A，CtrA 受磷酸化控制，因此多种激酶和磷蛋白在新月柄杆菌的发育过程的调节上有重要作用。蛋白质转换（turnover）也是很重要的，大量的在细胞周期中起重要作用的蛋白质，在它们的产物起作用的时候，自己会被立即降解掉。CtrA 能以正调控或负调控的方式调控许多基因的转录。在细胞周期过程中转录的改变以及 *ctrA* 发生变异后的效应已经通过微阵

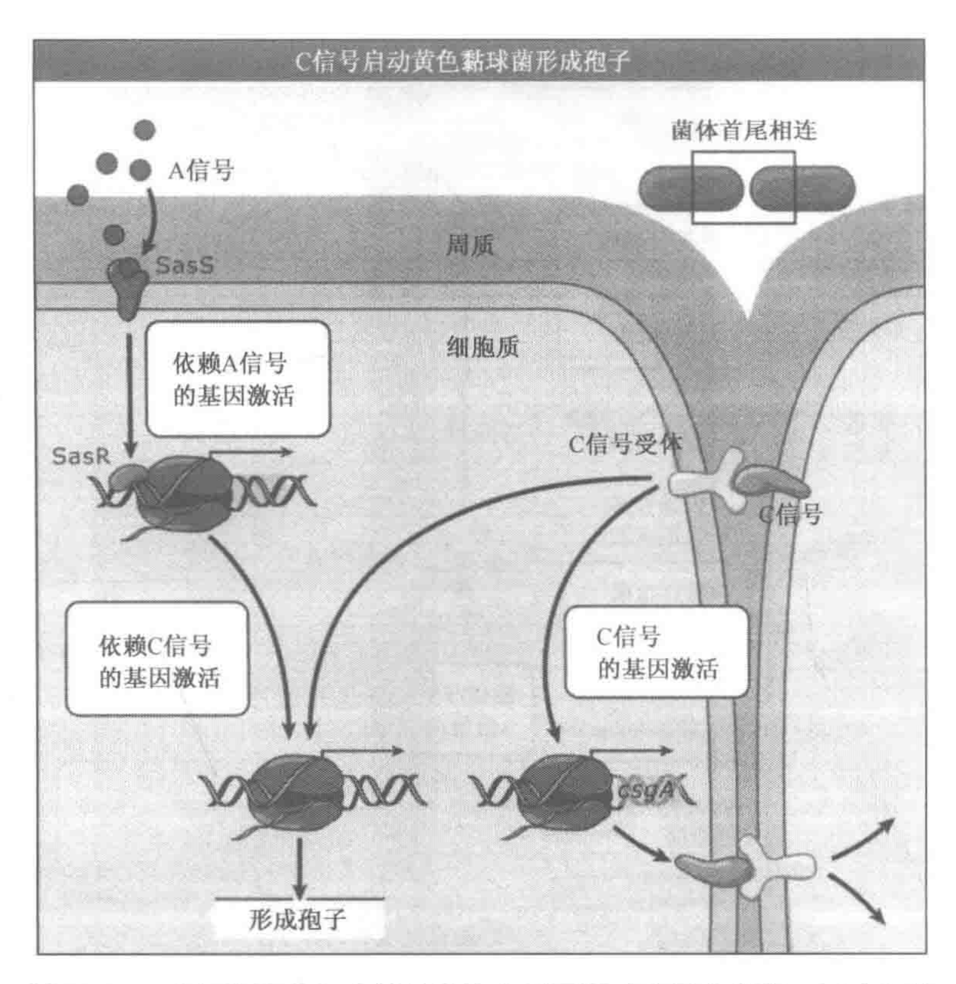


图 16.53 黄色黏球菌在 C 信号系统介导下形成孢子的概况。两个细胞在孢子形成时都对信号发生反应。但是为了了解清楚，只显示一个细胞中的信号途径。

列试验进行了详细研究。CtrA 也可以通过结合在 *oriC* 位点上直接控制 DNA 的复制。

新月柄杆菌能作为模式生物的一个重要特点是通过分离游动细胞就可以得到同步化的细胞。这样就可以在细胞周期中观察到基因表达和蛋白质积累的变化等情况。这些变化目前已经全部被绘制成图并被分类，这些工作将极大地促进人们对有机体细胞周期和发育过程的细节过程的更深入的认识。

16.19 一些原核细胞和真核细胞具有内共生联系

关键概念

- 线粒体和叶绿体是由自由生活的原核微生物整合进真核生物的细胞质内形成的，并成为真核生物细胞内的永久“共生居民”。
- 根瘤菌在豆类植物中形成根瘤，可以把氮元素转化为具有生物活性的氨。
- 豆长管蚜（一种昆虫）的发育和生存依赖于内共生的巴克纳氏菌的作用。

内共生描述的是两种有机体的共生关系，其中一个生活在另一个体内。通常情况下，这种相互作用对其中一个或对两者都有益。真核生物的进化通过内共生事件与原核生物紧密联系在一起。其中最著名的实例就是线粒体和叶绿体进入到真核生物细胞内。线粒体和叶绿体提供了发生氧化磷酸化（一种形成 ATP 的机制）的场所。如果没有线

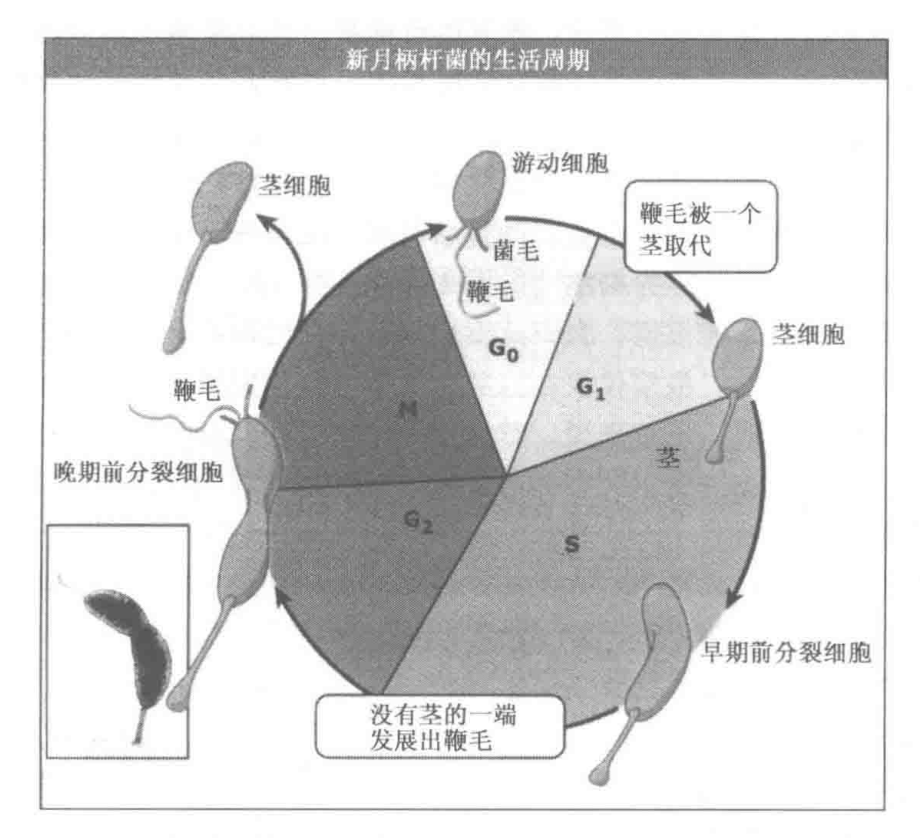


图 16.54 新月柄杆菌的生命周期图解。新月柄杆菌在正常的发育过程中出现两种细胞类型：游动细胞和茎细胞。照片由 Indiana 大学的 Yves Brun 惠赠。

粒体的存在，真核细胞就只有依靠无氧糖酵解来产生能量，这种方式与有氧呼吸相比效率极低。有氧呼吸产生的 ATP 分子数是糖酵解途径产生的 15 倍。毫无疑问的，在能量消耗大的动物组织如心脏和骨骼肌中需要大量的线粒体。在植物细胞内，叶绿体在光合作用中把光能转移到 ATP 中。

Lynn Margulis 已经提供简洁而确切和有说服力的证据证明线粒体和叶绿体曾经是自由生活的微生物，只是在某个时刻开始与真核细胞形成共生体。这类支持内共生理论的证据来自于许多前沿研究。这些细胞器肯定之前就已经单独存在，因为这些细胞器的蛋白质组成中只有很少一部分由细胞核编码，其余大部分是由其自身的遗传物质编码的。线粒体和叶绿体拥有独立的基因组，其结构就像原核生物的一样，单环 DNA 分子而没有伴随的组蛋白，并且可以独立于宿主细胞的复制而自主地复制和分裂。最有说服力的分子证据是线粒体的核糖体 RNA 基因明显地来源于原核生物而不是来源于真核生物。原生动物 *Reclinomonas americana* 的线粒体基因组序列大约有 70 个基因，几乎有一半是编码翻译复合体的元件，其余的基因编码与有氧呼吸产生能量有关的酶类。以 *Reclinomonas americana* 的线粒体核糖体蛋白、细胞色素氧化酶、NADH 脱氢酶为样品的分子系统发育学分析结果表明线粒体和 α-变形菌成员有紧密联系（见图 16.4）。α-变形菌的很多成员的生活都与真核细胞紧密联系，与动植物细胞不是形成共生关系就是寄生关系。出现在 α-变形菌（如普氏立克次体）中的能量产生系统与需氧的线粒体几乎同源，反映出它们有共同的祖先，也就是说线粒体的祖先是 α-变形菌家族中兼性厌氧菌的物种。然而，线粒体的原核生物祖先的基因组应该与现在的线粒体的基因组十分

不同，因为线粒体的进化是不稳定的，其基因可能被转移到细胞核内或者完全丢失了。

并不是所有的内共生事件都像线粒体和叶绿体一样被永久地捕获而保留下来。一些内共生关系的形成是以“需要”为基础的。这样的例子是固氮原核生物和它们的植物宿主。固氮作用（将大气中的氮气转化为氨）只能发生在某些原核生物中，但所有的有机体在生长过程中都需要氨。原核生物中的根瘤菌属的成员可以感染豆类植物的根毛，形成一团微生物的复合体，被称为根瘤，见图 16.55。根瘤菌产生的分泌型信号分子（结瘤因子）引发根部感染形成根瘤。当根瘤菌感受到特定的植物分泌的类黄酮化合物之后就会分泌结瘤因子。因此，根瘤仅仅在原核生物感受到特定植物分泌的类黄酮并随后分泌结瘤因子之后才能形成。反过来说，结瘤因子仅仅启动与分泌类黄酮的特定植物形成内共生。结瘤因子是寡糖分子。人类目前正在寻找植物根细胞上的结瘤因子受体，应用结合细胞提取物的方法鉴定了一些预测的结瘤因子受体。然而，用这种方法鉴定的受体与结瘤因子的结合是非特异性的，并且这种受体与活体细胞内的并不相像。用另一种寻找结瘤因子受体的方法，第一次鉴定了植物的糖结合蛋白，然后检测了其与结瘤因子的亲和性和特异性。这种方法还被用来鉴定称为凝集素核苷酸磷酸水解酶（lectin-nucleotide phosphohydrolase，LNP）的根定位蛋白（root-localized protein），这个蛋白可以特异地结合结瘤因子。LNP 的抗体可以阻断根瘤形成，表明 LNP 是根瘤形成过程中的重要因素。寻找其他的结瘤因子受体的尝试正在进行中。

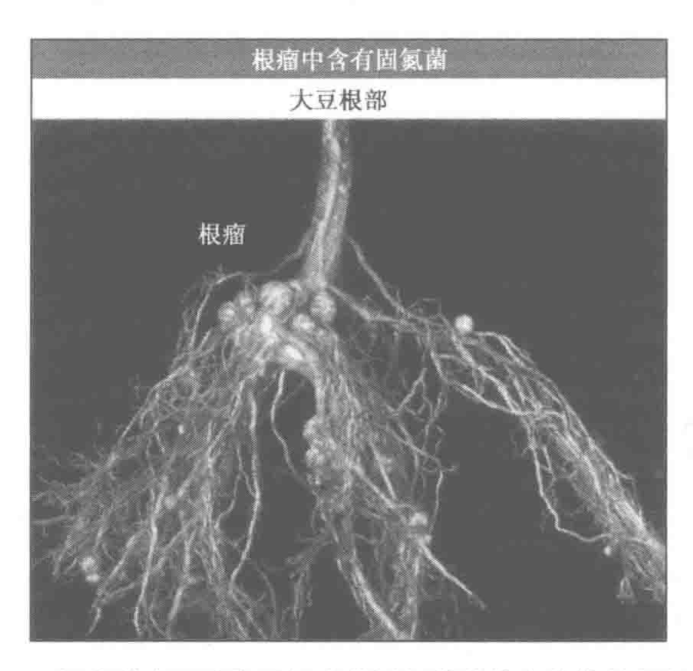


图 16.55　根瘤形成于感染了根瘤菌属细菌的特定植物的根部。这种内共生现象有利于植物：细菌可以合成植物在固氮作用中所需的氨。照片由 Harold Evans 惠赠。

许多昆虫依赖于内共生作用来进行发育和生存。被研究得比较详细的昆虫与原核生物的内共生关系的例子是豆长管蚜与巴克纳氏菌（*Buchnera*）形成的。巴克纳氏菌是一种变形细菌并且是其蚜虫宿主的严格内共生物。巴克纳氏菌存在于含菌胞内，这是一类昆虫体腔内的特殊细胞，见图 16.56。巴克纳氏菌在豆长管蚜体内按照母系传播的途径从昆虫卵子到胚胎中，使之存在于每个豆长管蚜的体内。为什么豆长管蚜能忍受巴

克纳氏菌的这种定植，答案是巴克纳氏菌可以提供给豆长管蚜必需的营养物质。蚜虫的食物主要是植物的汁液，富含碳水化合物但缺少氨基酸。在实验上，很难确定巴克纳氏菌为宿主提供的详细的营养物种类，但是巴克纳氏菌的基因组里含有可编码生成宿主所必需的氨基酸的酶类。进一步说，感染巴克纳氏菌的蚜虫能以人工合成的缺少必需氨基酸的食物为生。然而，如果对蚜虫施以可杀死巴克纳氏菌的抗生素后，蚜虫会很快因饥饿而死。从中可以清楚地看出，巴克纳氏菌可以为宿主提供必需的氨基酸。值得注意的是，不含巴克纳氏菌的蚜虫在含有必需氨基酸的全培养基上生长得依然很缓慢，表明巴克纳氏菌可以为宿主提供的不仅仅是必需氨基酸。

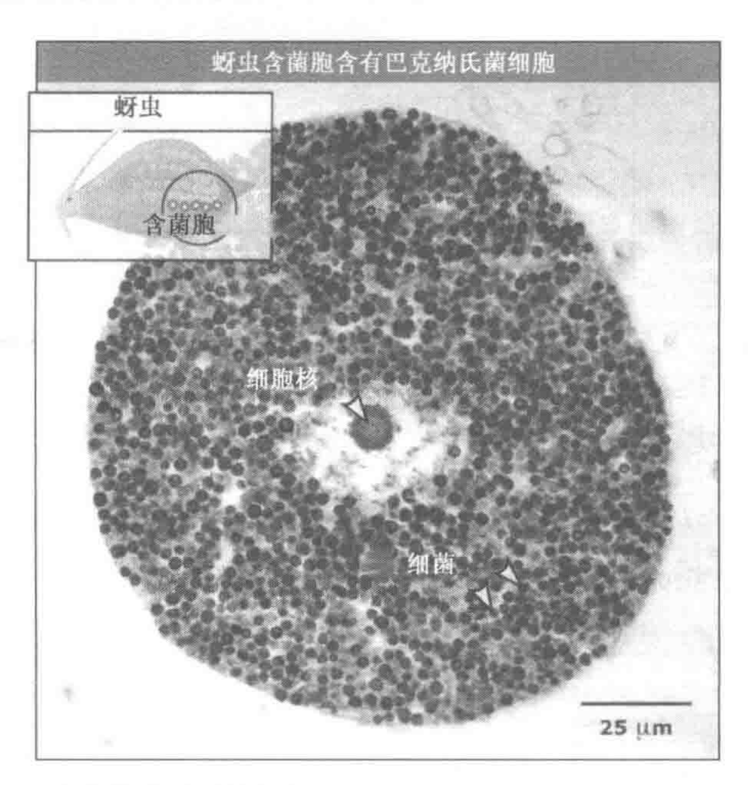


图 16.56 含菌胞是豆长管蚜体内含有巴克纳氏菌的细胞。上图是经过染色的含菌胞，显示出细胞核以及充满于细胞质中的细菌。照片由日本国立产业技术结合研究所的 Takema Fukatsu 惠赠。

16.20 原核生物可在高等生物上生存并引起疾病

关键概念

- 尽管有许多微生物生长在人类体内和体表，但只有很少一部分对人体有害。
- 病原菌一般可以在宿主组织内寄居、复制、生存。
- 许多病原菌产生毒性物质，使宿主细胞受到破坏。

动物的躯体富含营养，并且提供相对稳定的环境条件，如 pH、渗透压、温度。这些特征为多种原核生物提供了理想的生活条件。在两种不同的物种之间的紧密联系，如微生物和它的宿主之间，叫做共生关系。根据这种关系的好坏程度，宿主和微生物间的共生关系可以分为互利共生、偏利共生、寄生、致病，详细如图 16.57 所示。内共生现象详见前面所述（见 16.19 一些原核细胞和真核细胞具有内共生联系）。绝大部分的原核生物是无害的共生物，也就是说对宿主只有很小的或没有影响。有一些共生的微生物

对宿主是有益的，并且有一些种类是必不可少的。例如，肠内的大肠杆菌菌株有助于宿主的食物消化。

宿主-微生物之间相互作用的类型			
共生类型	特征	对宿主的伤害	实例
互利共生	双方获益	无	牛消化道中消化纤维素的细菌
偏利共生	某一机体获益，但对别的机体无影响	无	人类的消化道中，以人类摄取的营养为生的细菌
寄生	微生物依赖于宿主存活，有可能对宿主有伤害	轻微	
致病	微生物引起宿主发病	严重	如：炭疽芽孢杆菌（炭疽病），耶尔森氏杆菌（鼠疫）

图 16.57　共生关系的几种类型。根据相互的作用、对宿主细胞是有益还是有害进行分类。

当微生物在宿主体内或体表生长而没有对宿主产生益处，那么在某种程度上可以称为寄生。有很少一部分的寄生被证明对宿主是有害的。那些对宿主产生有害作用的微生物称为病原体。并且病原体寄居和引起疾病的能力是它们和宿主许多因子共同作用的结果。病原体可以被分为机会性的和原发性的。机会性的病原体仅仅在宿主缺乏免疫力的时候才能引起疾病，如重度烧伤者、AIDS 感染者和一些癌症患者。原发性的病原体可以引起正常的个体发病，在有些情况下它们的复制是完全依赖宿主的。无论病原体是什么类型，如果要发生感染，首先病原体要进入到宿主体内，寄居并减弱免疫系统的作用，然后大量复制。另外，原发性的病原体必定会从一个宿主传染的到另一个宿主。

在病原体引起疾病前，必须先进入到宿主组织并繁殖。主要的感染部位是暴露在外部环境中的部位，如皮肤或呼吸道黏膜、泌尿生殖系统黏膜和肠上皮的黏膜。微生物可分泌出几种不同的表面分子，可以与宿主组织的一些受体结合。这些黏附分子是由多糖或蛋白质组成的。例如，变形链球菌（*Streptococcus mutans*）是通过其富含多糖的荚膜黏附在牙齿表面的，进而引起蛀牙。多种微生物利用菌体表面的附属结构，如菌毛或纤毛黏附到宿主组织上。那些用于黏附的附属物常常被定义为病原体的毒力（virulence），如果没有这些附属物这些病原体就不会发生感染，而会被宿主细胞通过物理因子的作用而驱逐出去（荚膜的细节见 16.5 大多数原核生物产生一个富含多糖的结构层，称之为荚膜；菌毛的细节见 16.11 菌毛和鞭毛是大多数原核生物表面附属物）。

微生物的黏附具有物种和组织的特异性。这种组织专一性被称为亲和性。例如，淋病的致病因子：淋病奈瑟氏菌，可强烈地吸附在泌尿生殖道上皮细胞而几乎不会吸附到身体的其他组织的上皮细胞。物种特异性的例子是，大肠杆菌的致肾盂肾炎菌株（pye-

lonephritic strains）只能结合在人类、狗、老鼠的肾上皮细胞上。致肾盂肾炎的菌株可以分别表达出三种菌毛，每种菌毛对应上述三种个体中的一种。

一些细菌病原体侵入到上皮，然后开始产生致病性。侵入可以使细菌得到细胞营养，利于自身的复制。细菌通过上皮侵入到血管后，可以到远离侵入地点的地方生长。全身性感染往往就是病原体通过上皮细胞层进入到血液里或淋巴系统里后的结果。

因为刚进入机体的少量病原体往往不足以引起疾病，所以它们一定会在宿主体内大量繁殖从而引起疾病。宿主组织是细菌生长的潜在的理想场所。由于宿主组织不能充分满足微生物在生长过程中的几种关键营养，这些微生物必须充分利用宿主的营养资源，同时还必须抵抗宿主免疫系统的防御。因此微生物可以利用复杂的营养物，比如糖原就是被首先利用的。病原体可以与宿主细胞竞争微量元素，如铁元素。铁传递蛋白和乳铁蛋白是动物拥有的两种蛋白，其作用是为体内细胞结合和传递铁元素，因此宿主组织里只有很少量的自由铁元素存在。为了解决这种问题，细菌病原体产生一种更有效率的铁螯合复合体被称为铁载体（siderophore），可以帮助其从环境中集聚铁元素。

细菌病原体产生多种毒力因子（virulence factor）用于建立和维持感染。革兰氏阳性病原菌包括链球菌、葡萄球菌、肺炎球菌，可产生一种酶，可以分解宿主细胞的多糖物质，从而使其可以遍布整个组织。梭状芽胞杆菌产生胶原蛋白酶，可使连接宿主细胞的胶原网络解聚，进而可使它们遍布整个宿主。酿脓链球菌产生链球菌激酶，可使阻止病原体扩散的宿主纤维蛋白网络失去活性，进而可使自己散布整个组织。一些病原菌通过分泌一种可产生纤维蛋白凝块的酶把自己固定、包裹在一个具保护性的纤维蛋白凝块里。有一个被研究得较详细的这类酶是由金黄色葡萄球菌产生的凝固酶。产生这种酶的微生物可以把自己包裹在纤维蛋白内，这种方式被认为可以保护微生物免受宿主防御系统的攻击。

除了微生物在宿主组织中的定植和大量复制外，细菌产生的毒性可以破坏宿主细胞。分泌到细胞外的毒素称为外毒素（exotoxin），可以引起宿主机体较远距离的组织的破坏。根据外毒素的作用机制可以分为三类：①溶细胞外毒素，如溶血素，作用在宿主细胞质膜上，从而引起细胞的裂解。可溶血的菌株可以在血琼脂培养基上被很容易地鉴别出来，当菌株分泌溶血素时，其周围的血红细胞会被裂解，会在红色的平板上出现白色的区域。②白喉毒素，是由白喉棒杆菌产生的，可引起白喉病。当菌体处于低铁离子环境时（宿主体内），就会分泌白喉毒素，进入到宿主细胞内并通过抑制宿主细胞蛋白质翻译而产生毒性。③神经毒素，包括肉毒梭状芽胞杆菌产生的肉毒杆菌毒素。肉毒杆菌毒素是已知的对人类毒性最强的化合物之一。肉毒杆菌毒素可以阻断神经细胞释放乙酰胆碱，从而引起不可逆转的肌肉舒张和偏瘫。

每一个成功的病原体会由很多不同的毒力决定子组成。能产生强力毒素的病原体不需要侵入机体和大量繁殖就可以引起疾病。例如，破伤风梭菌就是非侵入性的，其产生的毒素往往是致命的。另一方面，肺炎链球菌是不产生毒素的，其凭借在肺部组织中大量的复制引起疾病。肺部组织里大量的入侵者引起宿主的免疫反应从而导致肺炎。对于原核生物的毒力因子的作用机制的认识，可以让我们发展出新颖的医疗方法来对付感染。

为了防御病原体，宿主拥有两种类型的防御机制：先天性的和获得性的。先天性防御是“结构性的”，也就是说它们总是存在的。先天性防御提供一般的保护，使机体免

受病原微生物的侵入、定植、感染。皮肤是一个很重要的先天性防御器官，保护体内组织防止病原菌的侵入。黏膜可分泌一些物质限制致病菌的生长，并阻止其侵入机体和定植。获得性防御分为细胞介导的免疫反应和抗体介导的免疫反应。这些免疫反应专一地提供机体发现之前遇到过的病原体的能力，进而可以有效地去除这些病原体。对于宿主与病原体之间的相互作用的动力学研究是当今的热点领域。

16.21 生物膜是高度有组织的生物群落

关键概念

- 有人估计地球上的大部分微生物以高度组织性的微生物群落的形式存在。
- 生物膜的形成包括以下几步：微生物在物体表面吸附，生长和分裂，产生多糖，生物膜成熟，最后裂解。
- 生物膜中的微生物以群体感应系统彼此进行信息交流。

地球上大部分的微生物以紧密联系的多物种聚集的生物膜的形式存在。具有充足水分和营养物质的表面最适合生物膜的形成。从结构上说，生物膜是蕈菌状的微生物菌落，其中有布满整个结构的复杂“液体管道”，进而为其中的微生物提供充足的营养。有机体在生物膜中被多糖基质包裹。形成固着生物膜（固定的）的微生物群落对人类有致病性，比如中耳炎（耳部感染）和囊性纤维病（见 2.26 补充：阴离子通道的突变引起囊性纤维变性）。可形成生物膜的部位包括留置导尿管装置、人工瓣膜，以及其他医疗器械可引起额外的医疗问题。

固着生活的微生物相对于游离的存在方式是有益的。首先，包裹在生物膜周围的黏性多糖基质可以帮助集聚碳、氮、磷酸盐，以及其他生物膜中的生物所需要的营养物质。其次，生物膜可以保护微生物不受抗生素、外界环境、宿主防御的影响等。生物膜还可以裂解，使微生物在新的地点形成生物膜。

生物膜的形成过程已经在实验室人工条件下被研究过。然而研究发现，这些生物膜与自然条件下形成的有明显的不同：在自然条件下，形成生物膜的微生物多种多样，并且不同的生物膜有不同的微生物组成，而在实验室条件下，微生物组成比较单一。另外，在自然条件下，生物膜在几乎所有的无机物表面都能形成，而在实验室条件下，只能在塑料和玻璃表面形成。但是，实验室条件下的研究有助于我们理解生物膜形成的复杂性。

从遗传学角度对大肠杆菌和铜绿假单胞菌形成生物膜的过程的深入研究发现，一些突变体不能在塑料表面形成生物膜。这些研究帮助我们得到了生物膜形成的逐步过程（图 16.58）。刚开始的表面吸附是可逆的并且需要微生物具有鞭毛。仍存在的问题是究竟是鞭毛在吸附过程中起主要作用，还是只是需要依赖鞭毛的运动性。一旦吸附上之后，就形成一个融合的单层结构，浓密地包裹着多个菌落。对于铜绿假单胞菌来说，菌落形成依赖于类型Ⅳ的菌毛。类型Ⅳ菌毛使微生物具有“抖动”（twitching）的活动性，利于细胞间的相互作用。因此，类型Ⅳ菌毛在两种途径促进生物膜的成熟：促进生长中的生物膜中细胞的相互作用和（或）促进微生物向生长的菌落运动。菌落的生长导致输送营养物质的“液体管道”的形成，而这一结构特点是生物膜成熟的标志。高分子质量的多聚糖把生物膜结合在一起。多聚糖可以提供保护，避免机体受到环境中浮游生物的攻击。一个成熟的生物膜是一种动态的结构，可以通过一个所谓的扩散过程把微生

物释放出去。这种情况可以以成块的形式出现，也就是说生物膜的一部分分裂出来，这一小块微生物群体还包裹在多糖基质里，因此仍然受到保护，并且吸附到附近的表面上之后可以继续生长。另一种情况是，具有活动性的微生物可以像浮游生物一样游动着离开生物膜，而生物膜的结构并没有改变。这种方式可以促进微生物“探测”环境中的一些地方是否适合菌落的生长，便于微生物在新的环境定植。

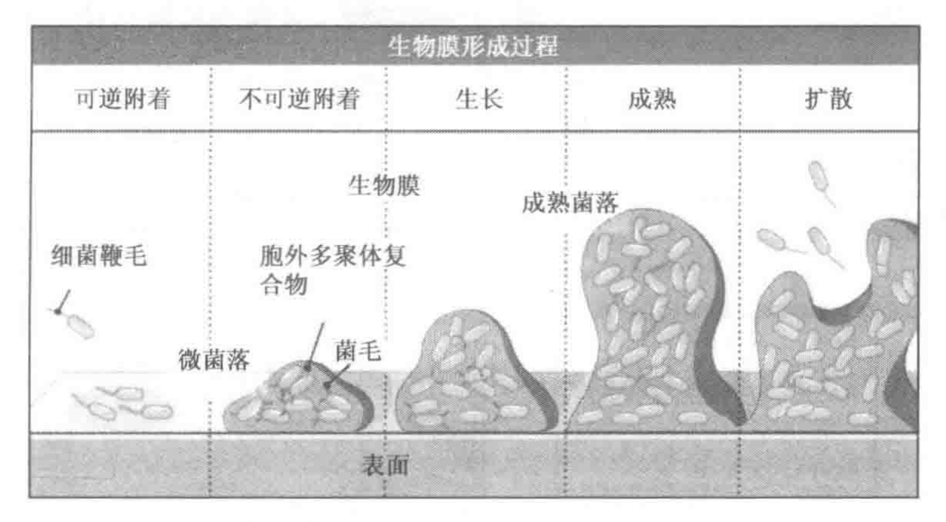


图 16.58 生物膜的形成过程包括细菌附着在表面、通过胞外多糖包被形成菌落。

生物膜代表了原核生物群落的最高形式。就像在所有群落中一样，个体成员间的联系是种群存在的关键。原核生物之间的联系是通过分泌可扩散的信号分子实现的，这些信号分子被称为自身诱导分子（autoinducer），可以协调基因的表达从而改变整个群体。因为自身诱导分子只有在达到一定量的时候才能被感受，它使微生物集中到一个很小的区域，并且分泌足够量的自身诱导分子，从而诱导基因表达的改变。基于这个前提，自身诱导分子基因的调节被称为群体感应。目前有三种自身诱导分子被报道：革兰氏阴性菌中的酰基高丝氨酸内酯（acyl-HSL）系统；自身诱导蛋白 2 系统在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中都存在；革兰氏阳性菌中的肽系统（peptide system）。群体感应在调节微生物的发育过程中具有作用。对于革兰氏阳性菌来说，表现在枯草芽孢杆菌的芽胞形成过程、粪肠球菌的结合过程、金黄色葡萄球菌的毒性作用，以及链球菌性肺炎的感受态形成。革兰氏阴性菌中也有很多发育过程受群体感应系统调节：费氏弧菌的光产生、铜绿假单胞菌的毒性作用，以及根瘤农杆菌和其他菌中的冠瘿瘤形成。

Acyl-HSL 感应系统的一般作用过程如图 16.59 所示。在这个系统中，acyl-HSL 合成酶中的 LuxⅠ家族的酶类催化 acyl-HSL 的形成。在低细胞密度时，群体感应调节基因处于非激活状态。然而，当 acyl-HSL 含量高于阈浓度时，LuxR 家族的转录调节子结合 acyl-HSL 并激活相关基因的表达。

HSL 信号在铜绿假单胞菌和变形链球菌中形成生物膜的过程中起作用。一个拥有突变的 *las Ⅰ* 基因（与 *lux Ⅰ* 同源）自身诱导蛋白缺失的铜绿假单胞菌不能形成成熟生物膜。如果在这些变异的菌株中加入外源的高丝氨酸内酯，就可以形成正常的生物膜。变形链球菌在牙齿表面形成生物膜，拥有在形成生物膜过程中起重要作用的 *luxS* 同源基因。然而，群体感应并不是总有利于生物膜的形成。比如在霍乱弧菌中，合成的高丝

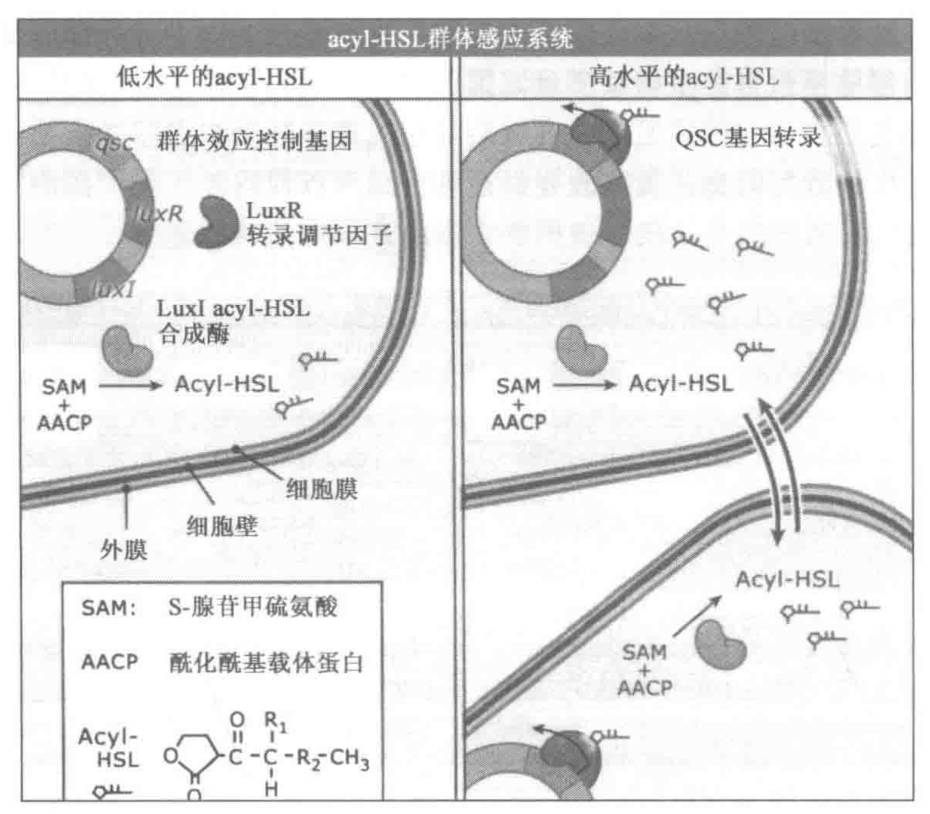


图 16.59 在酰基高丝氨酸内酯（acyl-HSL）群体感应系统中，acyl-HSL 作为信号分子被细菌合成。当细胞内积累的 acyl-HSL 的浓度达到阈浓度时，与转录调节因子一起激活与生物膜形成有关的基因的表达。在 acyl-HSL 的结构式中，R_1 代表 H、OH 或 O-，R_2 代表 $CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2CH_2$ 或 $(CH_2)_{2\sim14}$。

氨酸内酯可加快生物膜的溶解。群体感应系统很有可能在很多菌种的生物膜形成过程中发挥着重要作用。但是对于生物膜形成的分子水平上的理解仍然很不成熟。

生物膜研究中的一个热点问题是研究在固定的和游动生长的细胞之间总体基因表达类型的不同之处。这种分析研究将有助于对抗生素耐受和免疫系统耐受的分子基础的解释。近来，生物膜形成的遗传学只在铜绿假单胞菌和大肠杆菌中进行了详细的研究，因此同样的研究需要在其他菌种上进行，进而发现生物膜形成的共同特征。最后，由于绝大部分的自然形成的生物膜是由多种微生物共同作用的结果，因此应该进一步研究多菌种生物膜形成的驱动力。

16.22 展望

全基因组序列的研究已经达到了令人惊奇的速度，然而很多迹象显示这种速度还将进一步被加快。到目前为止，已经完成测序的微生物基因组几乎全是病原菌，但是在不久的将来，微生物的基因组将反映出整个微生物世界的多样性。据估计，只有很少一部分的微生物可以在实验室人工环境条件下获得纯培养，或许未被培养的个体最终也将被测序。细菌亚界的完整的序列数据将会供大家使用。相近的微生物的序列测定将允许对基因群的鉴定，这些基因具有使这个群从“附属的”基因中被鉴定和区分的特性，这将有助于认识这个群的多样性和适应性。

目前为止，我们只对很少种类的微生物的基因功能有很深刻的了解。一些基本过程如 DNA 复制和细胞分裂，已经开始在模式生物如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中进行了很

好的研究。然而，存在的一个很大的问题是这些机制是否在所有的原核生物中都有共同的特点，还是说对于一个给定的过程来说是否是有多种机制。找出生存问题的不同解决方法将对生命形式的多样化和在不同小生境的生存有重要作用。例如，支原体没有细胞壁因此不需要与肽聚糖合成有关的结构。这种特点可能使这个微生物具有病原菌的能力，可以逃脱周围环境中抗生素的攻击。理解这些微生物怎样适应失去肽聚糖的状况，将对于控制这些病原菌具有重要意义。

对于整个微生物的研究主要集中在应用经典方法获得的纯培养的菌株上。然而越来越清楚的是，很多微生物生活在群落中，在其中竞争和合作扮演重要角色。阐明这些群落中的微生物种类和它们相互作用的动力学特征要求我们发展出新的方法。目前有一些技术和工具可以应用，但是对于复杂的样品来说，需要对其进行调整和修饰才能应用。发展研究群落的方法就要面对前人难以解决的问题，特别是在某些领域，如胞间信号传递以及微生物竞争。人们对于单个机体和群落的认识将有助于我们增强对于原核生物在疾病方面的控制，并且可以提供某些方法操纵它们在生物技术、农业和医学中发挥作用。

16.23　总结

原核生物细胞与真核生物细胞的不同之处在于没有核膜并且只有很简单的细胞结构。基于其相对简单的结构，实验室中经常以此作为实验材料，对于原核生物的研究有助于我们对更复杂的有机体的理解。对于基本的细胞过程，如复制、转录和翻译等在所有的有机体中的进化上都是保守的，这方面分子水平的研究首先是在原核生物中进行的。即使是目前，许多原创性的发现都是在原核生物细胞中获得的。

分子系统发育学的方法揭示原核生物可以划分为两大类群：真细菌和古菌。这两个类群的区别基于一系列的生理生化反应以及结构特征的不同。原核生物倾向于拥有紧密包裹的环状染色体。染色体外因子可以增加它们基因组 DNA 的柔韧性，并且有多种机制可以使之进行遗传物质的交换和重组。现在，原核生物控制基因表达和细胞周期方面有关的机制开始被人们理解。一般来讲，这些机制在整个真细菌中是保守的，与真核生物的有一些不同。另一方面，古菌在某些特征方面与真细菌相同，而另一些特征则又与真核生物的相同。

原核生物细胞曾经被认为是由一个环绕的膜、一个充满各种酶类的细胞质，以及没有组织结构的一团 DNA 所构成。然而，近来的细胞生物学方法表明原核生物细胞是有高度组织结构的，在某些方式上类似于真核生物细胞。例如，细胞内含有许多特别的蛋白质，一些蛋白质在分布中表现出有组织的动力学改变，细胞骨架样蛋白维持细胞的结构。染色体表现为一团杂乱的物质，但实际上是有组织的，因此基因可以出现在预测的位置上。与原核生物 DNA 相连的蛋白质帮助组织染色体；在真细菌中这些组织元件形成拟核，然而古菌具有核小体，这与真核细胞相似。

在原核生物细胞中所存在的多种特点中比较重要的是跨膜分泌蛋白质和多糖的能力，这些蛋白质跨膜后在菌体表面组装成鞭毛和菌毛。鞭毛是运动因子，通过所谓趋化性的过程，为原核生物提供朝向食物运动的手段。菌毛是一种纤维状结构，有助于菌体间、与环境以及有时与宿主间的相互联系。鞭毛和菌毛的组装是通过特殊蛋白质的分泌以及组装系统实现的。

原核生物在新陈代谢和分解活性类型上具有令人惊奇的多样性。许多原核生物都自由地生活，并且它们占据着令人难以置信的多样的小生境。另有些原核生物生活在复杂的共生系统中，比如生物膜中的群落，或者作为病原菌生活在人类或别的原核生物中。我们无时无刻不与原核生物相互作用——我们周围的环境、食物，以及身体里都生活着无数的各种原核生物——然而我们仅仅刚开始认识到它们的多样性及其产生的影响。

参考文献

16.2 应用分子系统发育学技术研究微生物进化

综述

Bergan, T., 1971. Survey of numerical techniques for grouping. *Bacteriol. Rev.* v. 35 p. 379–389.

Woese, C. R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* v. 51 p. 221–271.

研究

Woese, C. R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 8392–8396.

Woese, C. R., 2002. On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 99 p. 8742–8747.

16.3 原核生物生命类型的多样性

综述

Black, J.G., 1996. *Microbiology: principles and applications.* Upper Saddle River, N. J.: Prentice Hall.

Meyer, H.P., Kappeli, O., and Fiechter, A., 1985. Growth control in microbial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 39 p. 299–319.

Staley, J. T., and Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 39 p. 321–346.

研究

Brock, T. D., and Darland, G. K., 1970. Limits of microbial existence: temperature and pH. *Science* v. 169 p. 1316–1318.

Ward, D. M., Weller, R., and Bateson, M. M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* v. 345 p. 63–65.

16.4 古菌属原核生物，但却与真核生物类似

综述

Gaasterland, T., 1999. Archaeal genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 2 p. 542–547.

研究

Forterre, P., 2002. A hot story from comparative genomics: Reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends Genet.* v. 18 p. 236–237.

Woese, C. R., and Fox, G. E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 74 p. 5088–5090.

16.5 大多数原核生物产生一个富含多糖的结构层，称之为荚膜

综述

Daffé, M., and Etienne, G., 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber. Lung. Dis.* v. 79 p. 153–169.

Ehlers, M. R., and Daffé, M., 1998. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: Are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* v. 6 p. 328–335.

Little, S. F., and Ivins, B. E., 1999. Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. *Microbes Infect.* v. 1 p. 131–139.

Roberts, I. S., 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 50 p. 285–315.

Sára, M., and Sleytr, U. B., 2000. S-Layer proteins. *J. Bacteriol.* v. 182 p. 859–868.

Whitfield, C., and Roberts, I. S., 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* v. 31 p. 1307–1319.

研究

Welkos, S. L., 1991. Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (pX01-) Bacillus anthracis. *Microb. Pathog.* v. 10 p. 183–198.

16.6 细菌细胞壁含网状结构的肽聚糖

综述

Goffin, C., and Ghuysen, J. M., 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 62 p. 1079–1093.

Höltje, J. V., 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 62 p. 181–203.

Lowe, J., van den Ent, F., and Amos, L. A., 2004. Molecules of the bacterial cytoskeleton. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 33 p. 177–198.

Smith, T. J., Blackman, S. A., and Foster, S. J., 2000. Autolysins of *Bacillus subtilis*: Multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* v. 146 (Pt 2) p. 249–262.

研究

Carballido-López, R., and Errington, J., 2003. The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev. Cell* v. 4 p. 19–28.

Daniel, R. A., and Errington, J., 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* v. 113 p. 767–776.

Denome, S. A., Elf, P. K., Henderson, T. A., Nelson, D. E., and Young, K. D., 1999. *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: Viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* v. 181 p. 3981–3993.

Jones, L. J., Carballido-López, R., and Errington, J., 2001. Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* v. 104 p. 913–922.

van den Ent, F., Amos, L. A., and Löwe, J., 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* v. 413 p. 39–44.

16.7 革兰氏阳性细菌细胞表面结构具有独特特征

综述

Barry, C. E., 2001. Interpreting cell wall "virulence factors" of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* v. 9 p. 237–241.

Foster, S. J., and Popham, D. L., 2001. Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, s-layers, and capsules. In Bacillus subtilis *and its closest relatives: From genes to cells.* Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R. M., eds. Washington, D. C.: ASM Press. p. 21–24.

Neuhaus, F. C., and Baddiley, J., 2003. A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 67 p. 686–723.

van Dijl, J. M., Bolhuis, A., Tjalsma, H., Jonglboed, J. D. H., de Jong, A., and Bron, S., 2001. Protein transport pathways in Bcillus subtilis: A Genome-based road map. In Bacillus subtilis *and its closest relatives: From genes to cells.* Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R. M., eds. Washington, D. C.: ASM Press. p. 337–355.

16.8 革兰氏阴性细菌具有外膜和周质空间

综述

Bardwell, J. C., and Beckwith, J., 1993. The bonds that tie: Catalyzed disulfide bond formation. *Cell* v. 74 p. 769–771.

Clausen, T., Southan, C., and Ehrmann, M., 2002. The HtrA family of proteases: Implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* v. 10 p. 443–455.

Gathel, S. F. and Marahiel, M. A., 1999. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 55 p. 423–436.

Sauer, F. G., Knight, S. D., Waksman, G. J., and Hultgren, S. J., 2000. PapD-like chaperones and pilus biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 27–34.

研究

Raivio, T. L., and Silhavy, T. J., 1997. Transduction of envelope stress in *E. coli* by the Cpx two-component system. *J. Bacteriol.* v. 179 p. 7724–7733.

16.10 原核生物具有几种细胞分泌途径

综述

Battner, D., and Bonas, U., 2002. Port of entry—the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* v. 10 p. 186–192.

Binet, R., Latoffa, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P., and Wandersman, C., 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters—a review. *Gene* v. 192 p. 7–11.

Ding, Z., Atmakuri, K., and Christie, P. J., 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* v. 11 p. 527–535.

Driessen, A. J., Fekkes, P., and van der Wolk, J. P., 1998. The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 1 p. 216–222.

Galan, J. E., 2001. *Salmonella* interactions with host cells: Type III secretion at work. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 17 p. 53–86.

Palmer, T., Sargent, F., and Berks, B. C., 2005. Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* v. 13 p. 175–180.

Pugsley, A. P., 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* v. 57 p. 50–108.

研究

DeLisa, M. P., Tullman, D., and Georgiou, G., 2003. Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 100 p. 6115–6120.

Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Palmer, T., and Berks, B. C., 2001. A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the "invariant"

arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett.* v. 497 p. 45–49.
Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E., and Aizawa, S. I., 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* v. 280 p. 602–605.
Madden, J. C., Ruiz, N., and Caparon, M., 2001. Cytolysin-mediated translocation (CMT): A functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell* v. 104 p. 143–152.
Stanley, N. R., Palmer, T., and Berks, B. C., 2000. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 11591–11596.
Veiga, E., de Lorenzo, V., and Fernández, L. A., 2003. Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: Surface properties of *Escherichia coli* cells displaying Jun/Fos dimerization domains. *J. Bacteriol.* v. 185 p. 5585–5590.

16.11 菌毛和鞭毛是大多数原核生物表面附属物

综述

Aizawa, S. I., 1996. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* v. 19 p. 1–5.
Aldridge, P., and Hughes, K. T., 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 5 p. 160–165.
Baron, C., and Zambryski, P. C., 1996. Plant transformation: A pilus in *Agrobacterium* T-DNA transfer. *Curr. Biol.* v. 6 p. 1567–1569.
Berg, H. C., 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 19–54.
Blair, D. F., 1995. How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 49 p. 489–522.
Brinton, C. C., 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans. N Y Acad. Sci.* v. 27 p. 1003–1054.
Frost, 1993. *Bacterial conjugation*. Plenum Press.
Hung, D. L., and Hultgren, S. J., 1998. Pilus biogenesis via the chaperone/usher pathway: An integration of structure and function. *J. Struct. Biol.* v. 124 p. 201–220.
Szurmant, H., and Ordal, G. W., 2004. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 68 p. 301–319.
Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., and Namba, K., 2002. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res. Microbiol.* v. 153 p. 191–197.

研究

Duguid, J. P., Smith, I. W., Dempster, G., and Edmunds, P. N., 1955. Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* v. 70 p. 335–348.
Karlinsey, J. E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S. I., and Hughes, K. T., 2000. Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. *Mol. Microbiol.* v. 37 p. 1220–1231.
Karlinsey, J. E., Tsui, H. C., Winkler, M. E., and Hughes, K. T., 1998. Flk couples flgM translation to flagellar ring assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* v. 180 p. 5384–5397.
Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H., and Hultgren, S. J., 1997. Prevention of mucosal *E. coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* v. 276 p. 607–611.
Rao, Kirby, and Arkin, 2004. Design and diversity in bacterial chemotaxis: a comparative study in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis PLoS Biol.* v. 2 p. 239–252.
Thanassi, D. G., Saulino, E. T., Lombardo, M. J., Roth, R., Heuser, J., and Hultgren, S. J., 1998. The PapC usher forms an oligomeric channel: Implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 95 p. 3146–3151.

16.12 原核基因组包含染色体和可移动DNA因子

综述

Casjens, S., 1999. Evolution of the linear DNA replicons of the *Borrelia* spirochetes. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 2 p. 529–534.
Hall, R. M., and Collis, C. M., 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* v. 15 p. 593–600.

研究

Mackenzie, C., Simmons, A. E., and Kaplan, S., 1999. Multiple chromosomes in bacteria. The yin and yang of trp gene localization in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Genetics* v. 153 p. 525–538.

16.13 细菌拟核和细胞质膜是高度有序的

研究

Lewis, P. J., Thaker, S. D., and Errington, J., 2000. Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* v. 19 p. 710–718.
Niki, H. and Hiraga, S., 1997. Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. *Cell* v. 90 p. 951–957.
Webb, C. D., Teleman, A., Gordon, S., Straight, A.,

Belmont, A., Lin, D. C., Grossman, A. D., Wright, A., and Losick, R., 1997. Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell* v. 88 p. 667–674.

Wu, L. J., and Errington, J., 1994. *Bacillus subtilis* spoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* v. 264 p. 572–575.

Wu, L. J. and Errington, J., 1998. Use of asymmetric cell division and spoIIIE mutants to probe chromosome orientation and organization in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* v. 27 p. 777–786.

16.14 细菌染色体以一种特殊的复制方式进行复制

综述

Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., and Marians, K. J., 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* v. 404 p. 37–41.

研究

Aussel, L., Barre, F. X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A. Z., and Sherratt, D., 2002. FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* v. 108 p. 195–205.

Espeli, O., Lee, C., and Marians, K. J., 2003. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* v. 278 p. 44639–44644.

Lemon, K. P., and Grossman, A. D., 1998. Localization of bacterial DNA polymerase: Evidence for a factory model of replication. *Science* v. 282 p. 1516–1519.

16.15 原核细胞染色体分离是在缺乏有丝分裂器的条件下进行的

综述

Brun, Y. V., and Janakiraman, R., 2000. The dimorphic life cycle of Caulobacter and stalked bacteria. In *Prokaryotic development*. Washington, D. C.: ASM Press.p. 297-317.

Gordon, G. S., and Wright, A., 2000. DNA segregation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 54 p. 681–708.

研究

Gitai, Z., Dye, N. A., Reisenauer, A., Wachi, M., and Shapiro, L., 2005. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* v. 120 p. 329–341.

Glaser, P., Sharpe, M. E., Raether, B., Perego, M., Ohlsen, K., and Errington, J., 1997. Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes Dev.* v. 11 p. 1160–1168.

Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., and Jaffé, A., 1989. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: Novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* v. 171 p. 1496–1505.

Ireton, K., Gunther, N. W., and Grossman, A. D., 1994. spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* v. 176 p. 5320–5329.

Kruse, T., Møller-Jensen, J., Løbner-Olesen, A., and Gerdes, K., 2003. Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* v. 22 p. 5283–5292.

Lin, D. C., and Grossman, A. D., 1998. Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* v. 92 p. 675–685.

Roos, M., van Geel, A. B., Aarsman, M. E., Veuskens, J. T., Woldringh, C. L., and Nanninga, N., 2001. The replicated ftsQAZ and minB chromosomal regions of *Escherichia coli* segregate on average in line with nucleoid movement. *Mol. Microbiol.* v. 39 p. 633–640.

16.16 原核细胞分裂涉及形成复杂的细胞动力环（cytokinetic ring）

综述

Errington,J., DanielR. A., and Scheffers,D. J. 2003. Cytokinesis in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 67 p. 52–65.

Jacobs, C., and Shapiro, L., 1999. Bacterial cell division: a moveable feast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 96 p. 5891–5893.

Margolin, W., 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 24 p. 531–548.

研究

Bernhardt, T. G., and de Boer, P. A., 2005. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* v. 18 p. 555–564.

Bi, E. F., and Lutkenhaus, J., 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* v. 354 p. 161–164.

Edwards, D. H., Thomaides, H. B., and Errington, J., 2000. Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. *EMBO J.* v. 19 p. 2719–2727.

Pichoff, S., and Lutkenhaus, J., 2002. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* v. 21 p. 685–693.

Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E. D., and Erickson, H. P., 2002. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 99 p. 3171–3175.

van den Ent, F., and Löwe, J., 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* v. 19 p. 5300–5307.

Wu, L. J., and Errington, J., 2004. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* v. 117 p. 915–925.

16.17 原核细胞通过复杂的机制对刺激发生反应

综述

Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 1 p. 117–126.

Hengge-Aronis, R., 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 66 p. 373–393.

Hengge-Aronis, R., 1996. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In Escherichia coli *and* Salmonella: *Cellular and molecular biology*. Neidhardt, F. C., et al., eds. Washington, D. C.: ASM Press. p. 1497–1512.

Kaiser, D., 2003. Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 1 p. 45–54.

Kaiser, D., 2004. Signaling in myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 58 p. 75–98.

Paidhungat, M., and Setlow, P., 2001. Spore germination and growth. In Bacillus subtilis *and its closest relatives: From genes to cells*. Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R. M., eds. Washingtonm, D. C.: ASM Press. p. 537–548.

Søgaard-Andersen, L., Overgaard, M., Lobedanz, S., Ellehauge, E., Jelsbak, L., and Rasmussen, A. A., 2003. Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* v. 48 p. 1–8.

研究

Ben-Yehuda, S., and Losick, R., 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell* v. 109 p. 257–266.

Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K. W., and Sonenshein, A. L., 2001. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.* v. 15 p. 1093–1103.

16.18 一些原核生物生命周期的发育改变是必然的

综述

Brun, Y. V., and Shimkets, L. J., eds., 2000. *Prokaryotic development*. Washington, D. C.: ASM Press.

Marczynski, G. T., and Shapiro, L., 2002. Control of chromosome replication in caulobacter crescentus. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 56 p. 625–656.

研究

Grünenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Röder, D., Langen, H., and Jenal, U., 2001. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 4681–4686.

Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M., and Shapiro, L., 2000. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* v. 290 p. 2144–2148.

16.19 一些原核细胞和真核细胞具有内共生联系

综述

Andersson, S. G., and Kurland, C. G., 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 2 p. 535–544.

Baumann, P., and Moran, N. A., 1997. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. *Antonie Van Leeuwenhoek* v. 72 p. 39–48.

Dyall, S. D., and Johnson, P. J., 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: Evolution and organelle biogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 3 p. 404–411.

研究

Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., and Kurland, C. G., 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* v. 396 p. 133–140.

Bono, J. J., Riond, J., Nicolaou, K. C., Bockovich, N. J., Estevez, V. A., Cullimore, J. V., and Ranjeva, R., 1995. Characterization of a binding site for chemically synthesized lipo-oligosaccharidic NodRm factors in particulate fractions prepared from roots. *Plant J.* v. 7 p. 253–260.

Douglas, A. E. and Wilkinson, T. L., 1998. Host cell allometry and regulation of the symbiosis between pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*, and bacteria, *Buchnera*. *J. Insect Physiol.* v. 44 p. 629–635.

Etzler, M. E., Kalsi, G., Ewing, N. N., Roberts, N. J., Day, R. B., and Murphy, J. B., 1999. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 96 p. 5856–5861.

Gray, M. W., Sankoff, D., and Cedergren, R. J., 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: A global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* v. 12 p. 5837–5852.

Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D.,

Turmel, M., and Gray, M. W., 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* v. 387 p. 493–497.
Margulis, L., 1971. The origin of plant and animal cells. *Am. Sci.* v. 59 p. 230–235.
Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., and Ishikawa, H., 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* v. 407 p. 81–86.

16.20 原核生物可在高等生物上生存并引起疾病

综述

Byrne, M. P., and Smith, L. A., 2000. Development of vaccines for prevention of botulism. *Biochimie* v. 82 p. 955–966.
Collier, R. J., 2001. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: A perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* v. 39 p. 1793–1803.
Efstratiou, A., 2000. Group A streptococci in the 1990s. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 45 Suppl p. 3–12.
Isenberg, H. D., 1968. Some aspects of basic microbiology of streptococcal disease. *N Y State J. Med.* v. 68 p. 1370–1380.
Klugman, K. P., and Feldman, C., 2001. *Streptococcus pneumoniae* respiratory tract infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* v. 14 p. 173–179.
Paradisi, F., Corti, G., and Cinelli, R., 2001. *Streptococcus pneumoniae* as an agent of nosocomial infection: treatment in the era of penicillin-resistant strains. *Clin. Microbiol. Infect.* v. 7 Suppl 4 p. 34–42.
Payne, S. M., 1993. Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.* v. 1 p. 66–69.
Rood, J. I., 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 52 p. 333–360.
Sharon, N., and Ofek, I., 2002. Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* v. 42 p. 267–272.
Tao, X., Schiering, N., Zeng, H. Y., Ringe, D., and Murphy, J. R., 1994. Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol. Microbiol.* v. 14 p. 191–197.
Turton, K., Chaddock, J. A., and Acharya, K. R., 2002. Botulinum and tetanus neurotoxins: Structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem. Sci.* v. 27 p. 552–558.
von Eiff, C., Proctor, R. A., and Peters, G., 2001. Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. *Postgrad. Med.* v. 110 p. 63–76.

研究

Haslam, D. B., Borén, T., Falk, P., Ilver, D., Chou, A., Xu, Z., and Normark, S., 1994. The amino-terminal domain of the P-pilus adhesin determines receptor specificity. *Mol. Microbiol.* v. 14 p. 399–409.
Jonsson, A. B., Ilver, D., Falk, P., Pepose, J., and Normark, S., 1994. Sequence changes in the pilus subunit lead to tropism variation of *Neisseria gonorrhoeae* to human tissue. *Mol. Microbiol.* v. 13 p. 403–416.
Kuehn, M. J., Jacob-Dubuisson, F., Dodson, K., Slonim, L., Striker, R., and Hultgren, S. J., 1994. Genetic, biochemical, and structural studies of biogenesis of adhesive pili in bacteria. *Methods Enzymol.* v. 236 p. 282–306.
Marklund, B. I., Tennent, J. M., Garcia, E., Hamers, A., Båga, M., Lindberg, F., Gaastra, W., and Normark, S., 1992. Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* pap and prs pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. *Mol. Microbiol.* v. 6 p. 2225–2242.

16.21 生物膜是高度有组织的生物群落

综述

Bassler, B. L., 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* v. 109 p. 421–424.
Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 49 p. 711–745.
Parsek, M. R., and Greenberg, E. P., 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 8789–8793.
Pratt, L. A. and Kolter, R., 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 2 p. 598–603.
Swift, S., Downie, J. A., Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Salmond, G. P., and Williams, P., 2001. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* v. 45 p. 199–270.

研究

Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L., and Li, Z., 1997. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 20 p. 291–303.
Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* v. 280 p. 295–298.
Hammer, B. K., and Bassler, B. L., 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* v. 50 p. 101–104.
Merritt, J., Qi, F., Goodman, S. D., Anderson, M. H., and Shi, W., 2003. Mutation of luxS af-

fects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* v. 71 p. 1972–1979.

O'Toole, G. A., and Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* v. 30 p. 295–304.

Potera, C., 1999. Forging a link between biofilms and disease. *Science* v. 283 p. 1837, 1839–1837, 1839.

Pratt, L. A., and Kolter, R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* v. 30 p. 285–293.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* v. 184 p. 1140–1154.

Xu, K. D., McFeters, G. A., and Stewart, P. S., 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* v. 146 (Pt 3) p. 547–549.

辛明秀　陈彦闯　译

第17章 植物细胞生物学

Clive Lloyd

Department of Cell and Developmental Biology,John Innes Centre,Norwich,UK

本章概要

17.1 导言

关键概念

- 植物和动物细胞具有截然不同的生长方式。
- 植物细胞坚硬的细胞壁阻止细胞运动和吸收大分子营养物质。
- 植物发育依赖于非移动细胞如何构建细胞壁。

早在生物进化为多细胞形式并分化形成动物和植物分支之前，单细胞生物就已在地球上生存了很长的时间。动植物分支出现时，真核细胞所具备的绝大部分特征已经形

成。因此，我们能看到诸如酵母、绿色植物和脊椎动物等真核生物的共同特征。例如，所有真核细胞的大多数遗传信息都储存在细胞核中；且拥有可以产生能量的线粒体。这些细胞器无论是在植物根的细胞还是在动物的肝脏细胞中都是基本一致的。植物和动物细胞所具有的共同特征将会在其他章节中详细论述。不管怎样，由于植物细胞与动物细胞的生长方式截然不同，我们可以发现其细胞内基本结构特征和组成是不同的。本章就是描述植物所特有的性征。例如，植物细胞的高尔基系统并不像动物细胞那样集中在原生质体内，而是遍布在细胞质四周以支持细胞的扩散式生长机制。细胞骨架的分布也能反映这种生长模式，其中微管聚集在细胞生长一侧的原生质表面。肌动蛋白纤维也不用于细胞运动的聚集，而是用于搅动那些比动物细胞体形大得多的非运动类细胞的原生质及其内含物。在动物细胞中发现的一种主要细胞器——中心体，却是在高等植物细胞中没有的。另一方面，植物细胞具有一些动物细胞没有的细胞器结构，而恰恰是植物细胞的特殊结构和细胞器，为我们理解植物细胞以完全不同的方式构建有机体提供了关键线索。

液泡。所有的细胞都会遇到这样一个问题，水分通过渗透作用穿过细胞膜进入细胞使原生质稀释。动物细胞通过膜上的离子泵将积累在胞内能导致水分流入胞内的过剩离子排出体外来解决这个问题。植物细胞则采用了一种完全不同的解决方式。植物细胞含有特殊膜围成的细胞器——液泡，可以吸收过量的水分。液泡吸水时引起植物细胞的膨胀使其体积能远大于动物细胞。并且在很多情况下，由于液泡占据了细胞内的大部分体积而将原生质挤成与原生质膜贴近的一薄层，从而使细胞一侧和另一侧仅以微细的原生质带相连通。植物细胞利用水充满液泡，使自身体积增大是非常有效的途径，比起产生同样体积富含蛋白的原生质可以大大节省能量。同时，对植物来说其重要性还在于许多植物生长的土壤中都缺乏合成组成蛋白质的氨基酸所必需的无机营养元素。

细胞壁。植物细胞原生质外围包裹着细胞壁，可以防止液泡过度膨胀造成细胞破裂。植物细胞壁异常坚韧，由坚韧如钢铁般的纤维组成，比动物细胞的任何组成结构都坚固。这些纤维包裹在细胞表面，以防其胀破。但是不管怎样，由细胞壁围成的“盒子”也阻碍了细胞的运动。以此为代价，由于水分流入细胞而建立起来的内部压力（或者称“膨压”）可起到扩大细胞体积的作用。细胞壁可适应细胞的生长而重塑，但最终细胞的形态还是受细胞壁重塑的模式控制。这也是植物细胞特有的细胞器分布和细胞骨架成分的作用之一。

叶绿体。坚韧细胞壁的存在阻止了植物细胞运动所需的可变性，使细胞限制在特定的位置。因此，使它不能寻找和捕获食物。这个难题因为绿色植物具有自我制造食物的能力而得到克服。这是由植物细胞的另一独特的细胞器——叶绿体实现的。是叶绿体使植物细胞无须移动，就可利用光能将CO_2转化为碳水化合物用于供能或转化成细胞壁组分的复杂多聚物。

上述三个相互关联的细胞器共存于细胞中，就构成了与“典型”的动物细胞截然不同的植物细胞。的确，无论植物细胞内部组织形式还是其参与有机体构建的方式都是不同的。这些差异的产生是因为细胞壁将植物细胞束缚在一起，使植物细胞不能像动物细胞一样进行形变和运动，因此也不能产生像动物发育过程中出现的复杂的细胞重排。与之相适应，植物的生长和发育中必须在细胞间相互位置鲜有改变的条件下完成，因此被

与动物细胞截然不同的机制所驱动。其实植物细胞利用一些最基本的机制，如通过细胞膨大、延展和细胞分裂方向的控制来完成生长和发育过程。

植物体内的细胞总是彼此密切接触的，那种认为一个孤立的“典型”植物细胞的想法是不切实际的臆断。出于这个理由，我们应该从探究植物生长方式入手，逐步了解植物细胞的结构特征。

17.2 植物怎样生长

关键概念

- 植物通过顶端生长延伸到环境中。
- 植物发育远超出胚胎期。
- 植物生长对环境敏感。

对植物而言，最明显的就是它们不能通过走路、爬行或游泳的方式去拓展环境空间，但是，他们可以通过生长进入环境空间。

对于人而言，当我们生长时，整个机体各部分细胞数量的增长或多或少总是基本一致的。我们的器官和四肢都按比例生长，所以当我们成年时，仅仅是体型比婴儿时期增大而已。植物的生长则不同，远不是有机体各部分均衡生长，都对体型增大作出贡献，而是在植物的整个生命周期中仅仅在某些特殊位点保持永久生长的能力。

这些特殊的位点被称为“分生组织”。图 17.1 显示了它们在植物体内的位置。位于根尖和芽尖生长点的分生组织被称作“初生分生组织”或“顶端分生组织”，是细胞分裂特别活跃的部位，提供植物生长所需的新细胞。通过新细胞的不断产生、延展，这些分生组织渐渐远离植物体的原有部位。这样，植物的根才更能深植入土壤中，茎才能更

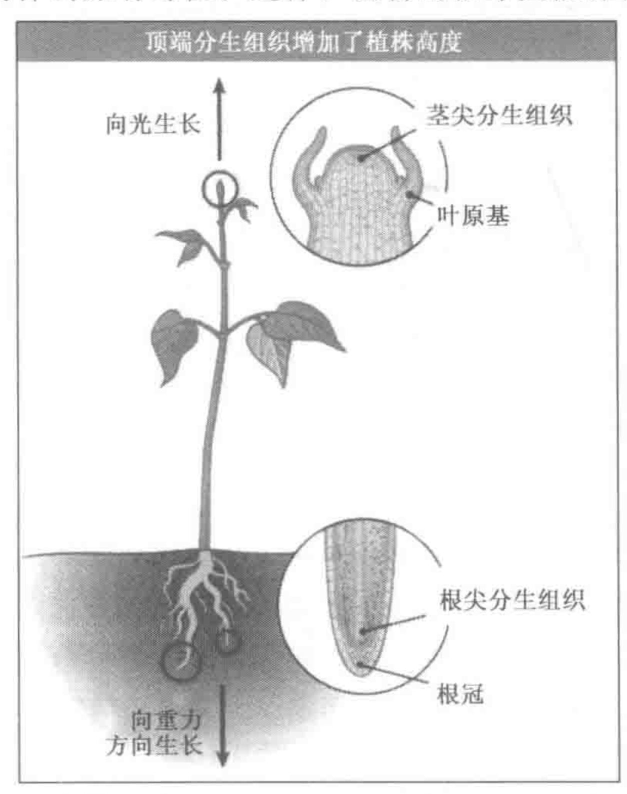


图 17.1 细胞分裂驱动植物生长限定在位于根尖和芽尖的特殊区域（分生组织），结构如插图所示。

多伸展到空中去接收阳光。原初分生组织为植物的高度增加提供原料，而位于成熟的根和茎部的四周的“次生”分生组织（称作“形成层”）的分裂，提供细胞使植物体增粗。

对于植株的生长发育，原初分生组织的生长是最直接的因素。随机的生长将会导致组织的无序和混乱。与此相反，植物的生长恰恰是沿着从根到茎的轴线所引导的方向。这是一条生长的主轴，植物所有的侧生器官（像叶和花）都围绕其上。该轴位于地上和地下的部分具有不同的功能。轴上端的芽生长点背地向光，向地上空间生长，使叶片暴露于阳光下收集光线，花朵展示在微风中，迎接昆虫。与此完全相反，根部分生组织的生长沿着地心引力、远离光照，深植于土壤中，为植物地上部分提供一个牢固的锚定点，同时吸收水分和必要的矿物元素用于植物生长。

随着茎尖的分生组织向上生长，根尖的分生组织逐渐向下生长，植物的两个主要生长点将被分离得越来越远。这就引发了一些机理问题。由叶片生产制造的有机营养物要运输到根部，水分和矿物元素要从根部运输到叶子，这些过程都需要特殊的专门通道。此外，随着植物的成长，位于生长点后面的组织必须变得坚韧，以保证给予永保分裂、向前生长的顶端分生组织提供结构支撑。我们将会看到细胞壁的特别增厚如何强化植物的新生组织，使之承受进一步生长的负荷。

植物除了与动物在组织形式上不同以外，还对环境更加敏感。植物的生长速率和（或）生长方向受多种环境因素的强烈影响，如地心引力、温度、日照时间和光照方向等。因此，动物生长发育的固定体形图早在胚胎期就可以被观察到，而植物生长发育的体形图则具有可塑性；通过对外部因素产生反应，不断进行分化和发育，比如通过分枝改变形态和产生花和叶子。这种通过器官重新排布的环境适应能力紧密依赖植物的持续生长能力。

植物保持原初生长点的能力的另一个结果是，与任何曾经生活在地球上的动物相比，它们长得更大且存活时间更长。如北美的巨杉，可重达 2000 t，高 100 多米，寿命数千年。

17.3　分生组织以重复方式提供新的生长模式

关键概念

- 顶端分生组织细胞分裂，在生长点产生新细胞。
- 新生长模块的重复添加引起生长。
- 细胞分裂，膨大，然后分化。
- 分生组织后部细胞体积膨大驱动生长点前移。

当我们瞥一眼长满枝芽的树时，就足以明白其最幼嫩的部分是充分伸展到环境中的最外缘部分，而支撑它们的是那些更靠近地面的老年部分。植物的生长方式是新生长的部分持续地反复累加于老的部分。这种生长模式依赖于顶端分生组织的周期性活动，在分生组织部位新细胞的产生使植物最新生长部位延伸、逐渐远离老的组织而深入到环境中。在我们探索这一生长机制的细胞活动过程之前，先简要地了解原初分生组织的内部结构，以及它的活动如何决定整株植物的形态。

如图 17.2 所示，茎尖分生组织的表面像是一个圆屋顶的形状。位于顶端圆屋顶中央的细胞通过分裂为主轴增加新组织。圆顶侧面的细胞分裂形成侧生的突起物；依赖于环境状况变化，这些突起物可分化成叶芽或花芽，从主轴伸展出来。这些侧生器官常常

按一定的间隔规律地生长构成复杂的模式，例如，侧生器官互生于茎的两侧或沿着茎的长轴呈螺旋式排布。图 17.3 展示了位于顶端分生组织后的侧生器官的生长模式规律，图 17.4 和图 17.5 利用图解说明了植物中侧生器官产生的模式类型。每一个侧生芽和它生出的茎构成一个生长模块，由顶端分生组织不断产生这种模块使植物长大。植物重复生长的基础涉及细胞分裂率和外部条件的复杂的相互作用，以及植物激素诸如生长素和细胞分裂素的调节。

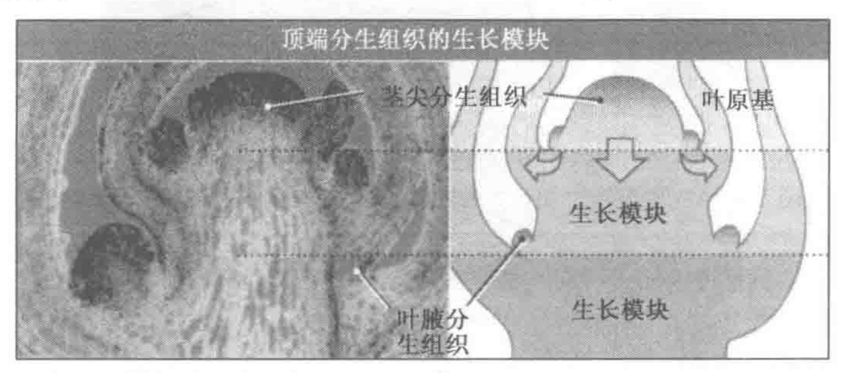


图 17.2　照片展示一株正在生长的金鱼草茎尖的纵向剖面图。细胞分裂的区域已通过细胞周期蛋白 mRNA 的原位杂交技术染成黑色，标记在顶端和叶腋的分生组织。右侧的图显示植物生长时顶端分生组织如何重复产生生长模块。箭头指示在顶端分生组织的中心，细胞分裂产生每个模块的茎部细胞，而边缘的分裂形成可发育为叶或花的原基。照片复制自 Gaudin，V.，et al. plant physiol. 2000. 122：1137-1148. Copyright 2000，美国植物生物学家协会。

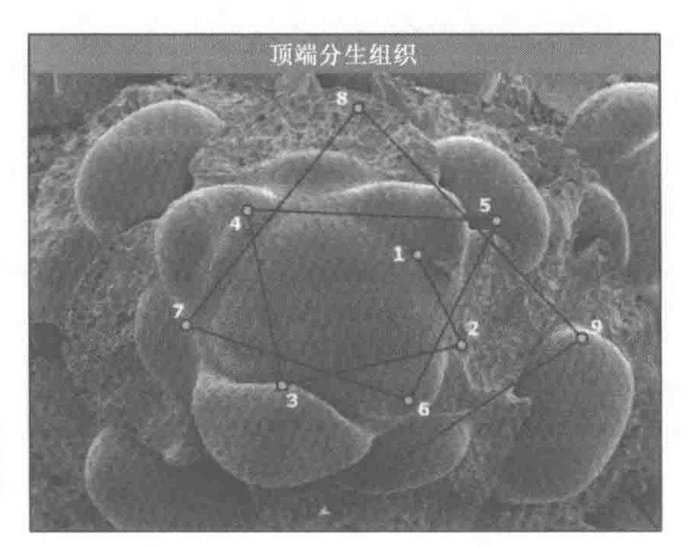


图 17.3　金鱼草生长中的茎尖电子显微镜扫描图像。顶端分生组织位于中心，由其产生的叶原基连续生长模块呈螺旋式排布。图中按其发生的新旧顺序排号。6 号、7 号已分化形成了叶片。照片由 John Innes 中心的 Enrico Coen 惠赠。

在植物发育过程中，由顶端分生组织分裂产生的细胞被用于构建主根-芽轴。分生组织产生的细胞，其中一个保留在分生组织，用于维持其结构和有丝分裂活性，而其他的细胞成为植物新组织构建的原料。因此，分生组织是一个自我无限繁衍的有丝分裂移动位点。当顶点的分生细胞因为分裂而前移，后续的分裂产物逐渐停止细胞分裂。然后，它们经历一段剧烈的膨大延伸期，使体型比刚分裂形成时增大许多倍，最后分化成

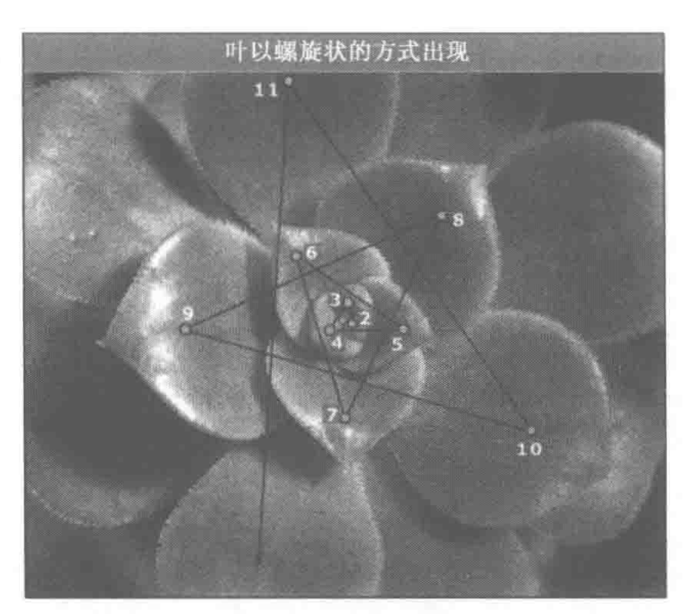


图 17.4 位于生长点之后连续产生的叶片呈螺旋状排列。照片由 Hans Meinhardt 拍摄，见 http://www.eb.tuebingen.mpg.de/meinhardt。

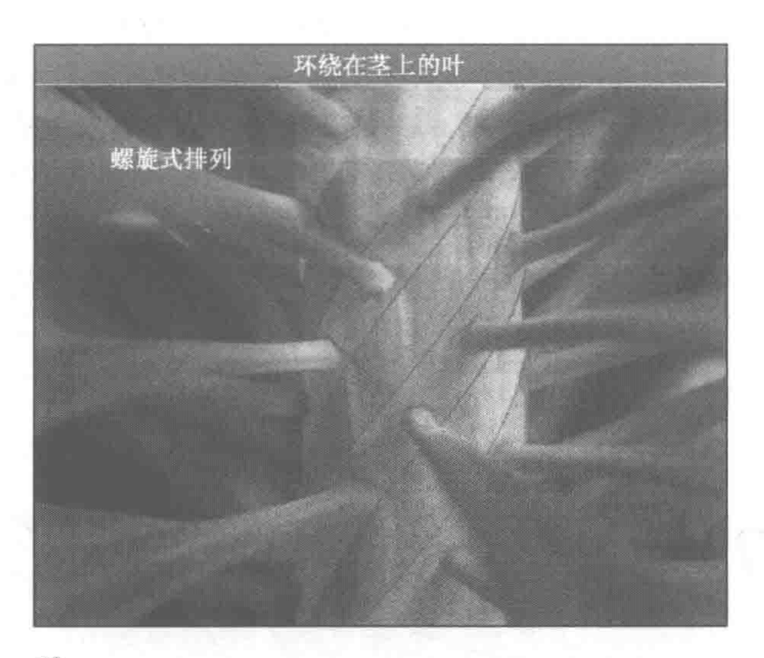


图 17.5 图示植物，沿茎部螺旋式排列的叶片。照片由 Hans Meinhardt 拍摄，见 http://www.eb.tuebingen.mpg.de/meinhardt。

为根或茎的组织。这三个过程发生在相互重叠的区域，这可以沿着分生组织区域的长轴观察到。在顶部区域是细胞分裂区，细胞有丝分裂主要发生在这个区；紧随其后的是细胞膨大伸展的伸长区；再后更接近植物成熟组织的区域细胞开始分化。

顶端分生细胞的复分裂产生梯状排布的向后延伸细胞。位于分裂区的细胞很小，只有很小的液泡或者完全没有液泡。当进入伸长区时，所有的细胞均已形成液泡。液泡的膨大驱使细胞发生显著的延展膨胀，其体积扩展为分裂区细胞的几十乃至几百倍。如果膨胀仅仅是一种普通的活动，就像吹气球，那么生长就不过是产生一个细胞泡，植物就不可能生长到超过地面数厘米的高度。

但是实际上，细胞膨胀并不是在所有的方向平均发生的。重要的是，细胞膨胀是固定地沿着生长轴进行的，细胞沿轴拉伸的过程中也使长轴自身延长。所以细胞在伸长区不仅体积变大，而且也变得非常长。图 17.6 说明了位于分生组织后的细胞显著伸长的过程。在这个过程中，液泡可膨胀到占据细胞 95%的体积，以至于将细胞质挤压成为原生质膜下的薄薄一层。正是顶端生长点后部细胞具有方向性的大量延伸，驱动顶端分裂细胞深入周围环境，并带动侧生器官前移。方向性的细胞延伸是植物一个重要的形态发生策略。在本章的后面内容，我们将着眼于这一过程是如何被细胞骨架和细胞壁之间的特殊关系所调节的。

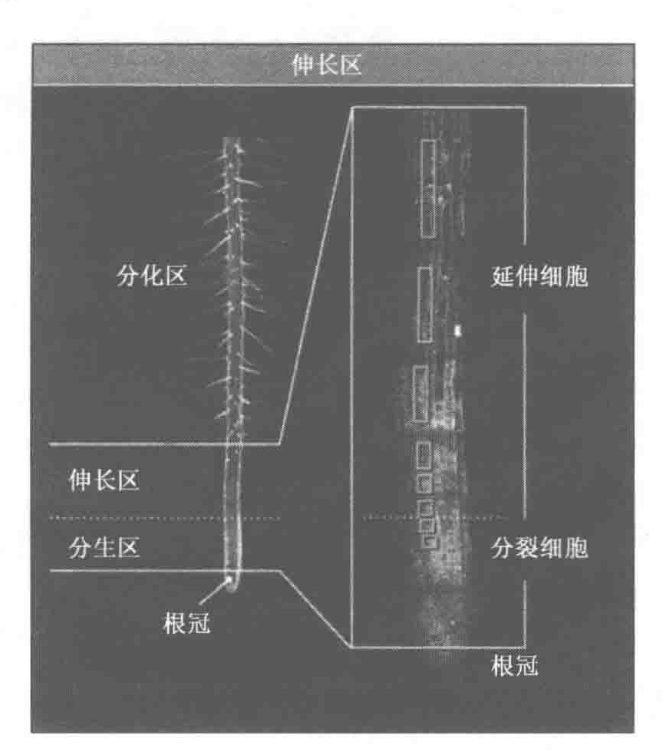


图 17.6　左侧图显示普通显微镜下，拟南芥植株的根部，位于生长点后细胞行为连续变化的三个区域。右侧图是根部照片的放大，植株微管经染色显示，且单个细胞的轮廓可辨。沿植物根部不同位点的细胞，其形状、相对大小和长度如图中所示。左侧照片由 John Innes 中心的 Keke Yi 惠赠。右侧照片复制自 Sugimoto，K.，Williamson，R. E.，and Wasteneys，G. O. Plant Physiol. 2000. 124：1493-1506. Copyright 2000 美国植物生物学家协会。

位于分生组织后部细胞的延伸和分化是伴随着细胞壁的改变而实现的。细胞的延伸需要细胞壁有可塑性：既要足够坚韧以维持细胞的形状，又要有能力适应引起细胞延伸的作用力。与之相适应的是位于分生区和伸长区的还在生长的原生细胞壁相对薄但可塑性强。而在分化区，细胞停止生长，细胞壁加厚变硬。这些硬化的“次生”细胞壁合成了结构上更坚固的材料，用于固定和维持植物已有的形态，并支撑继续向前生长的组织区域。

尽管植物生长必需的细胞分裂局限在分生组织，但是许多已分化的细胞仍保留着分裂能力。例如，一个叶片被动物啃食，伤口附近的细胞就能重新启动分裂活性以愈合伤口。事实上，成熟植物细胞的分裂能力已经超出了譬如我们抓伤皮肤后体现的伤口愈合方式。许多非分生组织细胞能够重新恢复有丝分裂，重新启动发育程序而形成新的器官或新的完整植株。因此，这些细胞是全能的。园艺学家利用这种特性越过了正常的有性

繁殖途径，对植物进行克隆繁殖，获得更多均一性的植物体。例如，将非洲紫罗兰的叶片切成小碎片，可以克隆繁殖出许多完全一样的植株。

17.4 细胞分裂面对组织形成是十分重要的

关键概念

- 因为缺乏细胞运动，分裂板的方向帮助决定植物形态。
- 程序性分裂产生新细胞类型；增生性分裂增加更多的细胞。

围绕在每个细胞四周的细胞壁对植物如何发育和器官形状的决定起着基础作用。不能像动物细胞一样通过改变自身位置或形态来完成发育，植物分生组织细胞是固定的。细胞壁固定了它们的形态，并将其束缚在一起而不能彼此分开。因此，细胞分裂是植物细胞唯一的机会可以确定自身与其他细胞之间的相对位置。细胞壁的存在意味着分裂不能发生像动物细胞原浆移动期所看到的典型的核周细胞质的缢缩。取而代之的是，植物细胞通过构建横跨细胞的新细胞壁进行分裂。这个新细胞壁的平面受到精细控制，因为它已经被构建起来就不能旋转或移动位置。分生组织中细胞分裂方向的决定，对于植物体内细胞的排布和分布以便分化成各种功能性组织都是一个重要的过程。

为了观察细胞分裂面的改变对其所产生的组织的影响，如图 17.7～图 17.9 所示，以矩形细胞的分裂为例做简单说明。如果细胞及其子细胞都沿着同样的横断面方向分裂，会形成一列末端相连接的梯形细胞。方向性延伸能拉长这列细胞；但是，只要这列细胞继续保持同样的方向分裂，它只能是一队单一排列的细胞。这种生长形式在简单的丝藻类植物中可见。相反，如果这排细胞的某个位点，其中某个细胞按与先前分裂方向成垂直方向进行分裂，那么这列细胞将被劈成两条平行细胞。如果在第二层分裂面上重复上述劈裂过程，将形成一个扇面细胞群，非常像叶子的表面。当然，植物体内是以三维结构存在的。随着细胞分裂方向改变的策略性时间调控，细胞排布的三维结构会展现出来。

产生一个三维结构正常的根需要不同类型的细胞分裂协调完成。根可以被认为是一列列细胞捆绑成束的结果。从前面的例子中知道一列细胞中的细胞可能垂直于轴或平行于轴进行分裂。这两种分裂形式分别被称为“横向分裂”和“纵向分裂”。每种类型的细胞分裂对根形成的贡献不同，每种类型的分裂次数和位置决定了根的最终形态。“横向分裂”（增生分裂）通过增加一种类型细胞列中的细胞数量使根增长。如果我们找出位于分生组织后部的某一单独的一列细胞并跟踪到根的顶端，可以观察到这列细胞起始于一个特殊的原初细胞的不同方向的细胞分裂。通过纵向分裂可以新产生一列细胞，这种分裂方式也被称为“格式化”分裂。由格式化分裂所产生的两个子代细胞及其后代具有不同的命运。所以，不管哪种组织，其中的细胞列都是在其分化以前由根基的顶端分生组织的原初细胞沿纵向分裂产生的。环状和辐射状的纵向分裂产生了植物的三维立体结构。拟南芥，一种广泛用于遗传实验研究的小植物，其根部的交叉部分可以说明这种三维结构。他们具有同心层的细胞排列模式，每一层都有高度可预期的细胞数量。格式化分裂对于这种细胞排布模式的重要作用可以通过突变体来说明，这些突变体不能完成细胞排布模式，所以不能形成正常的根部结构。事实上，植物之间正常模式的高度相似性揭示了植物产生这种模式结构的分裂方向和次序是在遗传控制下高度可重复的。

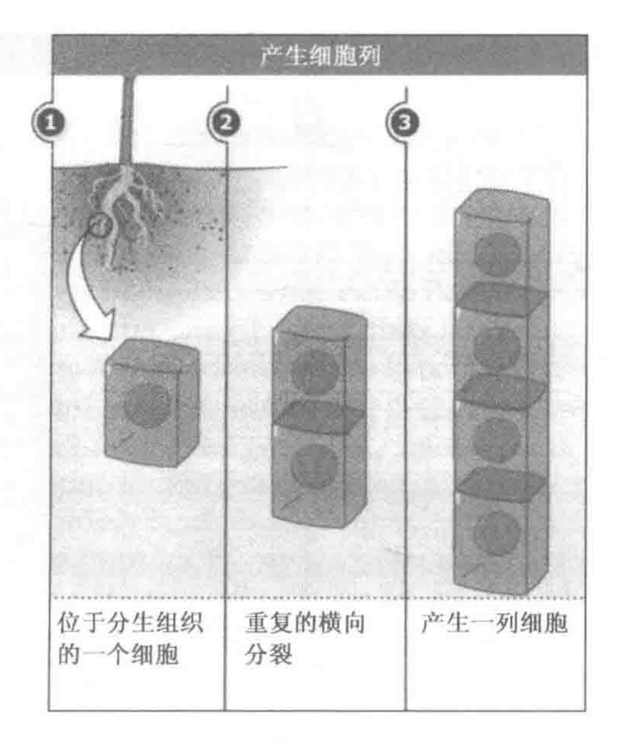


图 17.7　图中顺序显示同一方向的重复分裂有助于根的形态构建。横向分裂产生细胞使根或芽长度增加。

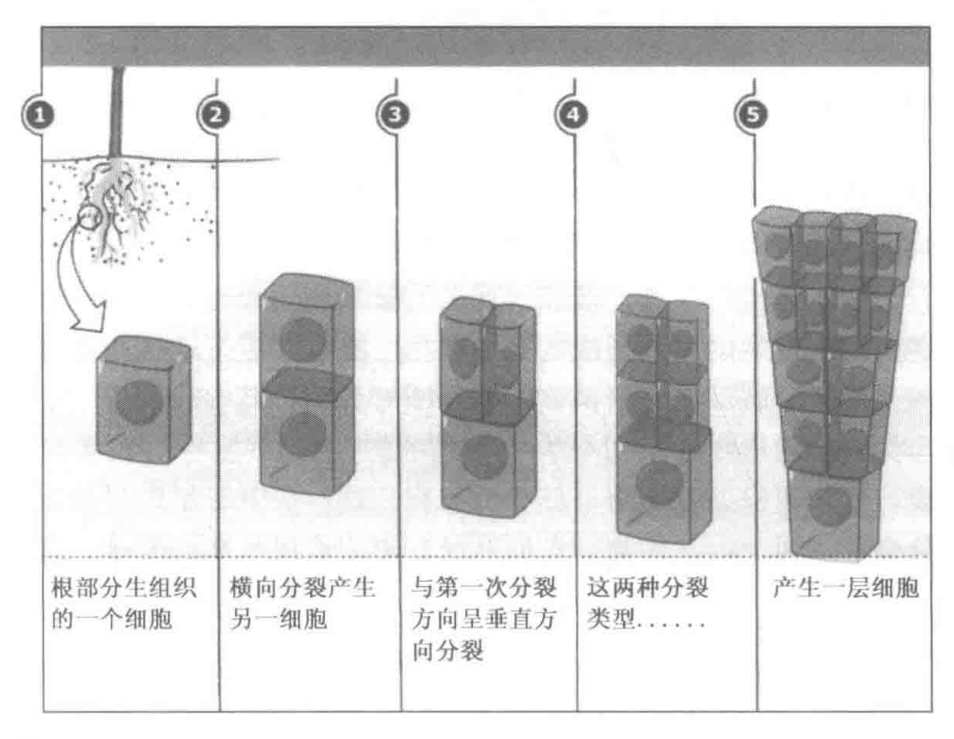


图 17.8　图中显示出两个方向的协调分裂如何产生新的细胞列。这两种类型的分裂最终形成一细胞层。

无论怎样，也有特例揭示细胞分裂面可能对器官形态的形成不是那么重要。例如，叶片中通常以横向分裂增加细胞列的长度，在某些情况下，有些细胞列的横向分裂被呈一定角度的分裂所代替。虽然形成了不同的细胞排列方式，但叶片的总体形状维持不变。

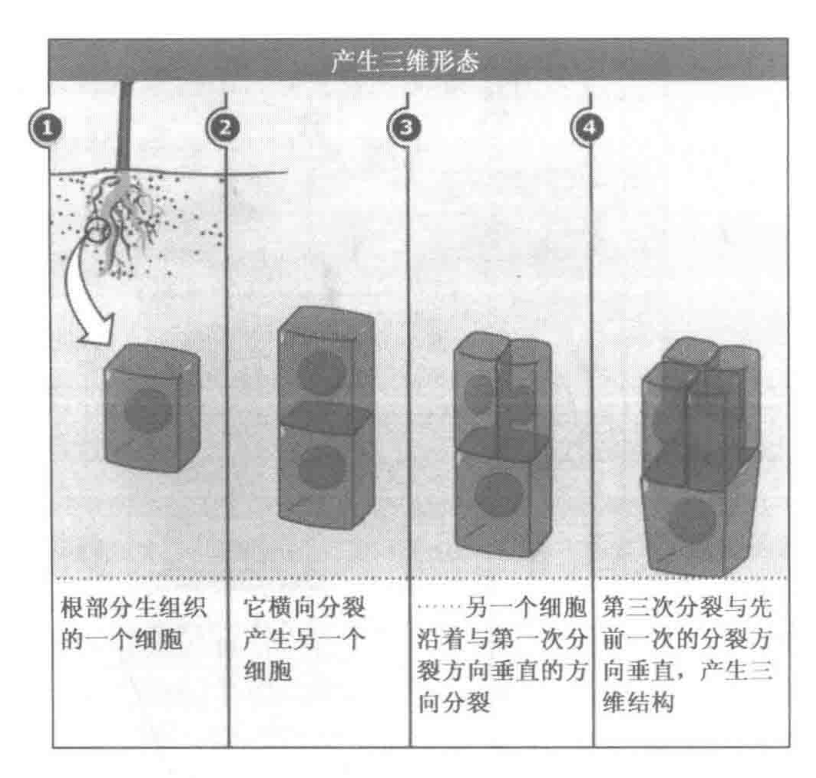


图 17.9　图中顺序显示出协调分裂能产生三维细胞群。不同方向的分裂不必都按图中顺序发生。植物体复杂的形状由细胞不同方向的三种分列类型的数量和顺序的变化而产生，通过细胞伸展协调。

定向型细胞分裂有时被用于排布小细胞群形成器官或赋予一些特殊细胞的特殊形态。两种情况都在气孔的形成过程中有所体现。气孔位于叶子的下表面，气孔的开张闭合允许气流和水蒸气进出叶片组织。气孔仅由少量的细胞组成：数量可变的（依植物种类而定）“辅助”细胞，加上一对半月形的“保卫细胞”，正是保卫细胞通过膨压驱动而张开或关闭它们围绕形成的气孔。形成气孔的一组细胞，如图 17.10 所示，通过一系列特殊顺序的定向细胞分裂的协调形成气孔的结构。这组细胞形成气孔的顺序是由表皮一列细胞中的一个横向分裂形成开始；该分裂是不对称的，其中较小的一个是保卫细胞的前体——称为保卫细胞母细胞（GMC）。同时，邻近两列细胞中的相邻细胞也进行非对称的弯曲分裂，形成使保卫母细胞呈杯状的细胞。这时保卫母细胞与邻近细胞列平行进行纵向对称分裂形成两个保卫细胞，它们彼此分离后形成气孔。因此，通过多种分裂面的细胞分裂形成气孔复合体，对于该组织的功能是至关重要的。

17.5　有丝分裂前的细胞质结构预定了细胞分裂的方向

关键概念

- 细胞分裂面在有丝分裂之前，依据原生质表层微管和微丝纤维组成的环形成预定。
- 有液泡的细胞中一薄层细胞质板也预定了细胞分裂面。

是什么决定将一个植物细胞分开的新细胞壁形成的位置呢？令人惊奇的是，这不是有丝分裂纺锤体所决定的，因为有丝分裂中期染色体排列的赤道面并不总是新细胞壁形成的位置。这表明决定植物细胞壁形成的机制与动物细胞决定分裂位点的机制大不相同。在细胞壁形成位置，动物细胞的纺锤体和原生质表层的相互作用定位形成收缩环，

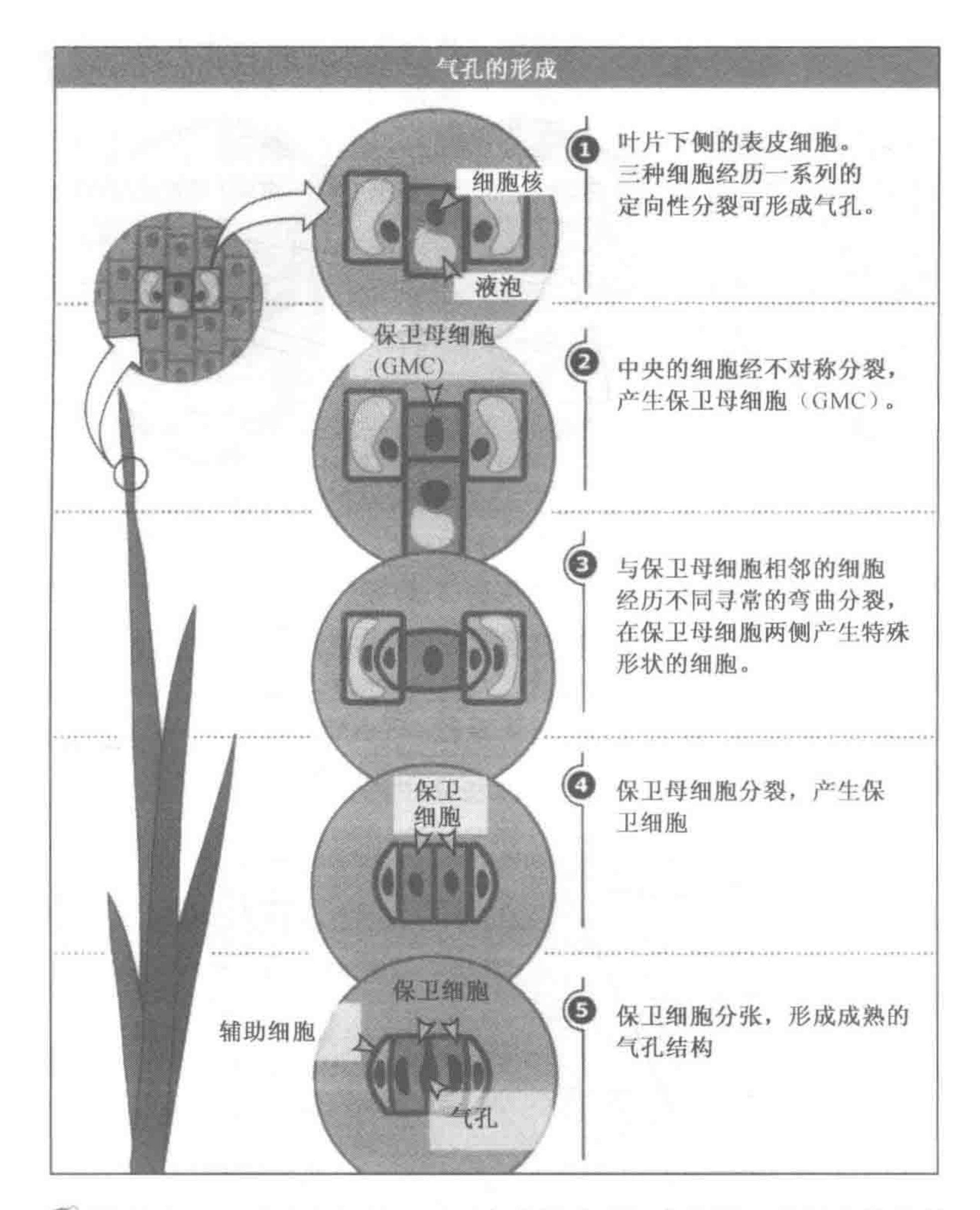


图 17.10　一小组细胞的一系列定向性分裂，产生了一种具有特殊结构的气孔。起初三类未分化的细胞聚集在一起。在细胞排布过程中遗弃的分裂产物留在叶片内作为普通的皮层细胞，不形成气孔的功能性细胞。

一种肌动球蛋白组成的可通过缢缩完成细胞原生质分裂的细胞结构。

在植物细胞中新细胞壁的位置早在有丝分裂前就已确定，甚至早在分裂初期就通过植物所特有结构——早前期带的方式首次体现出来。这种结构形成于细胞周期的 G_2 期，此时微管迅速在细胞质膜下聚集，环绕细胞排列成一条宽带，这些结构变化如图 17.11 和图 17.12（见图版）所示。肌动蛋白微丝纤维也聚集于此带中，其作用是使带变窄，直到其成为一条明确清晰的、环绕细胞四周的紧密的维管束。如果分裂将产生两个等体积的子细胞，这条带就在细胞中央形成；但是将要发生不对称分裂时，这条带则在靠近细胞的某一端形成。除了带内的微管和微丝外，其他从细胞核表面向外呈放射状延伸的纤维将核连接到早前期带。这样早前期带完成窄化时，其整体结构似轮子状，轮缘和轮辐由肌动蛋白微丝和微管组成，轮毂就是细胞核。这种结构也富集着粗面内质网（ER）和高尔基体分泌的囊泡，这两者都可能与早前期带中的细胞骨架组分形成有关。

早前期带及其与细胞核相连的微管纤维都在有丝分裂的早期解聚消失。这一过程发

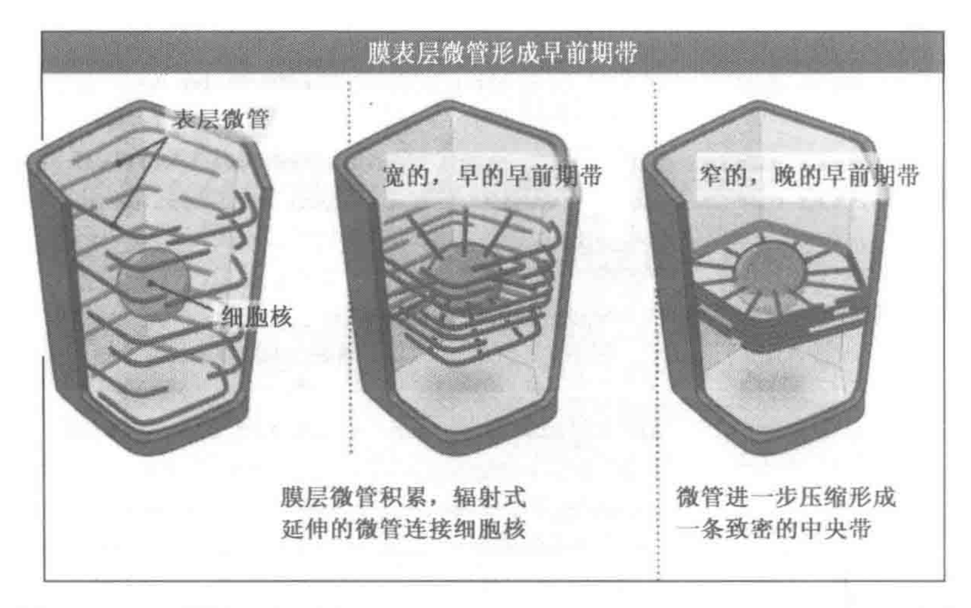


图 17.11　左侧图显示间期细胞的微管在膜表层平均分布。随着有丝分裂期的临近，微管逐渐从细胞两端消失并在细胞中央积累，最终形成一条致密的带。细胞核位于带所在的同一平面上，并由放射状排布的微管与中央带连接。有丝分裂即将开始。

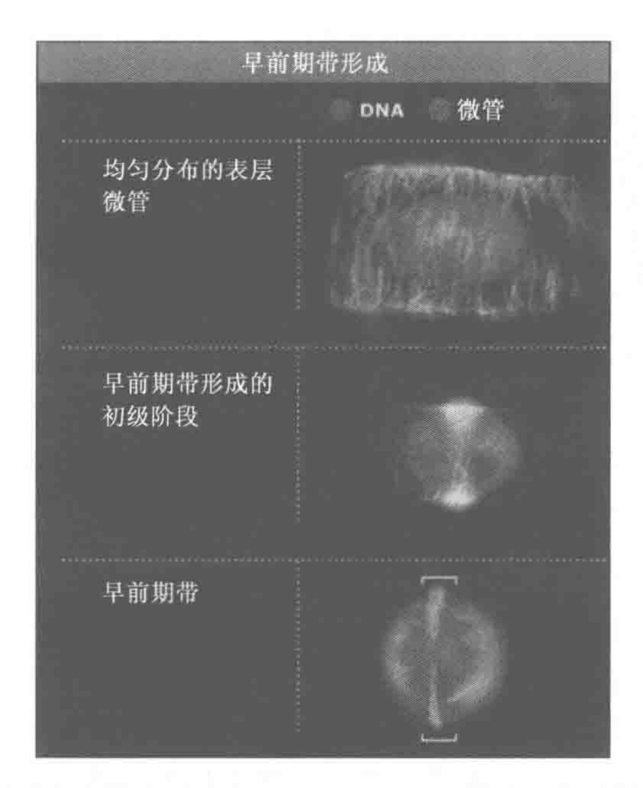


图 17.12　图示单个细胞的早前期带形成。微管呈绿色，细胞核呈蓝色。最下图中早前期带已形成，垂直固定地环绕细胞核中央的一条细带。带两侧弥散的微管结构是前期纺锤体的两部分。注意在早前期带形成的过程中细胞核保持完整，并且当早前期带形成时，在细胞表层没有其他微管存在。照片由动物健康研究所的 Sandra McCutcheon 惠赠。

生在纺锤体形成期间，并且在出现新细胞壁形成的任何迹象之前。尽管这条带消失了，但是在有丝分裂后期新细胞壁形成的位置恰恰与先前早前期带所确定的平面完全一致。

这说明尽管这条带的大部分可视组分消失，但仍在细胞表面留下了某种标记。一种可能性是早前期带在细胞质表面的特定区域留下一些分子物质，促使细胞盘与原细胞质膜的融合。另外，留在带位置的分子能在某种程度上调控新细胞壁从细胞中央向外周生长。微丝纤维也是调控新细胞壁向外生长的可能性因素，因为在有丝分裂整个过程中微丝一直在细胞中央和原生质表层之间起连接作用。

早前期带并不是预示细胞分裂面的唯一结构。另一结构产生在那些准备分裂的具有大液泡的细胞中。液泡可以占据一个植物细胞的绝大部分体积，具有大液泡的细胞分裂遇到这样的问题：如何在没有原生质的区域构建细胞壁。事实上，这个问题早在有丝分裂期之前就得到解决，通过细胞只重排在细胞分裂面的位置产生一层跨越细胞内部的细胞质板。这层细胞质有时占据不到5%的细胞体积，但是有丝分裂纺锤体形成和新细胞壁的构建都基于此结构。

具有大液泡的细胞分裂首先需要的是移动细胞核。高度液泡化细胞的核在间期通常固定限制在细胞质表层的一薄层，而在有丝分裂开始前通常被重新放置在细胞中央。起初，仅仅少数几条原生质链从核中延伸出来，穿过液泡，与细胞的另一侧相连。在准备分裂期间，原生质链的数量增加，细胞核从表层移至细胞中央。图 17.13 展示了处于这一时期的细胞，很明显这些原生质链中显然含有大量的肌动蛋白纤维，这似乎表明是肌动球蛋白的收缩性质牵引细胞核到达中央位置。

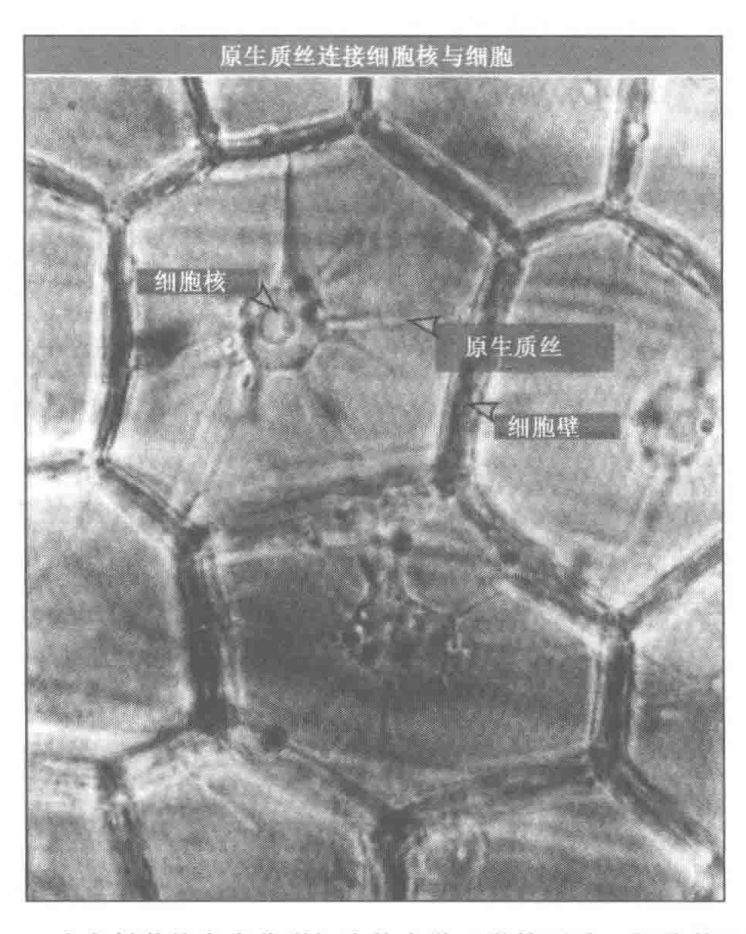


图 17.13 响应刺激的表皮分裂细胞的光学显微镜照片。细胞核已迁移至细胞中央，分裂即将开始。细胞内大部分空间被液泡所占据，横穿细胞、连接核与细胞膜的原生质丝清晰可见。照片由 Clive Lloyd 惠赠。

一旦细胞核到达细胞中央，它就向各个方向辐射出原生质链。图 17.14 展示当细胞分裂临近时，原生质链在细胞质表面的末端穿过质膜移动，在同一个平面中聚集、融合形成一个穿过液泡的连续的原生质板。这种由微丝和微管纤维所支撑的细胞质结构被称为隔膜（源自希腊语，障碍之意）。隔膜与早前期带在细胞分裂的同一时期形成，二者位于同样的平面。很明显，这两种结构必须协调一致，但具体协调方式我们还一无所知。连接细胞核和质膜表层的微丝、微管纤维可能发挥作用，它们可能是与小的分生组织细胞核相连的细胞骨架元件的高度分化形式。

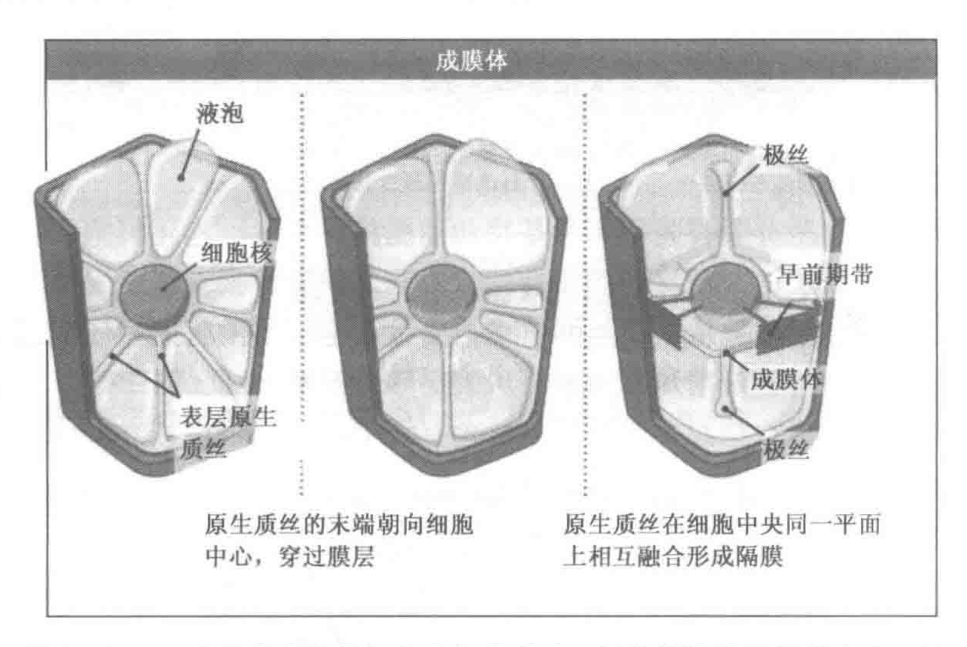


图 17.14　一个具有液泡的细胞准备分裂时，细胞核被移至细胞中央。呈放射状的原生质丝将其与膜层相连。大部分原生质丝的末端穿过液泡膜层并相互融合形成一层连续的原生质，就形成了成膜体。一少部分原生质丝（“极丝”）并不包含在成膜体内，而是在细胞两端保持核与膜层的连接。成膜体形成位置与早前期带所在的平面一致。

不是所有的原生质链都接合形成隔膜。少数原生质链保持分离状态延伸到细胞核表面，并与隔膜形成的平面呈直角，这些原生质链称为“极”链，连接细胞核和质膜表层，与纺锤体极到极之间的轴排成一行。当这些极链被离心和微丝解聚药物破坏后，纺锤体将不能正确排布，这揭示出与其他参与细胞分裂结构的不同，它们与有丝分裂器的排列有关。

17.6　植物有丝分裂没有中心体

关键概念

- 植物的纺锤体极不含有中心体，比动物的纺锤体呈现更多的弥散性

在讨论如何在前有丝分裂期时所预定的分裂面上构建细胞壁这个问题之前，我们必须简要回顾有丝分裂的中间过程。尽管植物和动物的有丝分裂基本一致，但在一些重要方面植物细胞有所不同。

植物的有丝分裂开始时，细胞核被一种由微管构成称做“前期纺锤体”的结构所环绕，图 17.15（见图版）显示出这种结构。尽管该结构有纺锤体的外形，但它还不是一

个真正的有丝分裂纺锤体，因为它还没有与染色体相连接。当核膜裂解、微管能够与染色体连接的时候，前期纺锤体才形成真正的纺锤体。与此同时，早前期带的微管解聚。而在动物细胞，一旦有丝分裂纺锤体形成，细胞质中除了与细胞核连接的微管，没有其他微管。

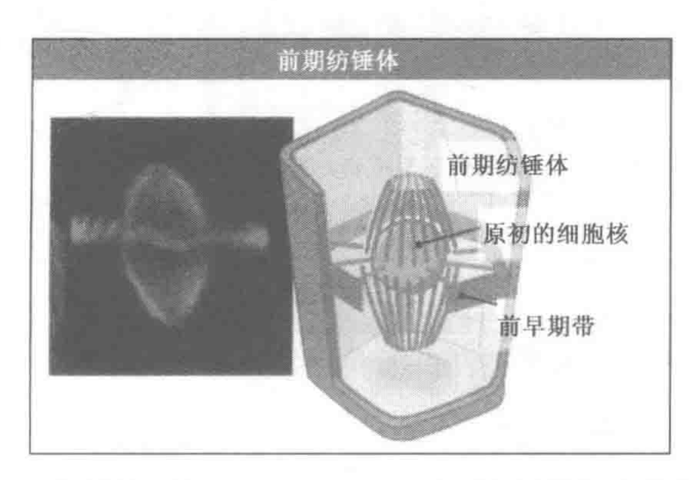


图 17.15　前期纺锤体在有丝分裂前的短暂时间围绕细胞核形成。该纺锤体与早前期带成垂直方向，并且一旦染色体变得可接近，就演化成有丝分裂纺锤体。左图是一个悬浮培养的烟草细胞的前期纺锤体（从上到下）和早前期带（水平的）的照片。微管呈绿色，DNA 呈蓝色。照片由 Sandra McCutcheon 和 Clive Lloyd 惠赠。

植物细胞有丝分裂纺锤体的组织形成过程与动物细胞一致。如图 17.16（见图版）所示，两者都是两套定位方向相反的微管装置在细胞中央汇集，并在此与染色体对相连。不管怎样，这两种类型纺锤体两极的结构有很大不同。大多数动物细胞中，纺锤体微管汇集在极部的固定的某一点，这个点是由一种叫做中心体的细胞器所确定的。

每个中心体由一对中心粒和围绕其四周的云状物质构成，这团云状物质在纺锤体组装过程中起着微管组织中心的作用。从复制的中心体辐散出来的维管束，在动物细胞以两极为基础的纺锤体形成中起着核心作用。植物细胞不具有中心粒，所以两极的结构与动物不同。植物纺锤体的极部比动物纺锤体的要宽泛一些，这或许与缺少一个充当微管纤维聚焦点的定位细胞器有关。有些情况下，植物纺锤体的“极”过于偏离原位，以至于几乎无法比纺锤体其他部分更窄了。

没有中心体组织形成纺锤体的极，植物的纺锤体是如何形成的呢？准确地说，植物纺锤体是怎样装配起来的还不十分清楚，但是有两种主要方式能建立两极。一种可能性是纺锤体的形成由染色体自身所启动，就像在一些没有中心体的动物细胞类型中所见到的那样。这种机制是由在缺乏中心体的条件下形成纺锤体的体外实验所揭示的。图 17.17（见图版）显示这一实验中将发生的事件顺序。首先微管在染色体附近以随机方向成核化。微管上的马达蛋白，能够同时结合并移动两种相反极性的微管，然后分拣不同极性方向的微管汇集在每条染色体的相对两侧。分类马达蛋白的分子特性能使微管以其正极朝向染色体的方向排布，并通过结合动粒——染色体着丝点的微管结合位点与染色体相连。与此同时，其他一些蛋白能够将微管的负极捆扎成束。这三类活动——成核、分选和成束——共同作用的结果是围绕每条染色体形成一个具两极的纺锤体。这样

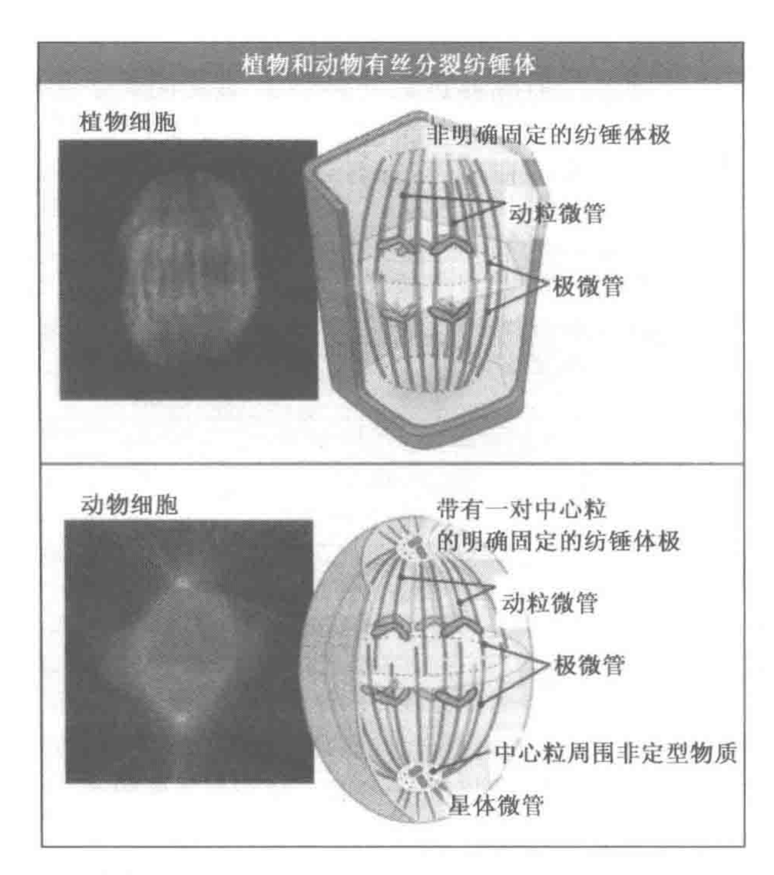


图 17.16　植物与动物有丝分裂的不同主要在两极的构成。动物纺锤体两极紧密集中在中心粒周围，有大量的星体微管，而植物纺锤体极较为弥散，且星体微管也少得多。由此造成形态上区别如左图中所示。微管呈绿色，DNA 呈蓝色。动物纺锤体两极附近围绕中心粒的区域可见到两个明亮的黄点。上图由 John Innes 中心的 Andrey Korolev 惠赠，下图由 Cambridge 大学的 Christian Roghi 博士惠赠。

通过为数不多的基本活动的作用，尽管没有中心粒和中心体，一个两极纺锤体也能被建立起来。值得注意的是，两极的组织依赖于微管本身的极性，使得它们可以被分选和束连成两个相对的末端聚集点。

不仅如此，植物纺锤体也能够通过更类似动物细胞纺锤体形成的机制来形成。尽管没有中心粒，植物纺锤体可以通过位于两极的物质起始微管的集聚和成核过程。中心体的结构预示了这种可能性，中心体包含了一对中心粒及围绕其周围的大量特殊蛋白。当用电子显微镜观察时，这些蛋白围绕中心粒形成一团无定形的云状物质。这种结构内部组分被认为具有使纺锤体微管聚集成核的作用。中心粒的功能可能是将这种物质聚集在某一点形成中心体，而植物细胞的这种物质缺少完整可见的组织形式，但仍具有聚集微管的成核和起始纺锤体形成的作用。这种猜测来自核膜裂解前，一些植物细胞中标记纺锤体极部位置的两个“极帽”结构（见图 17.12 中的早前期细胞）。最近已在植物中发现一些在动物细胞围绕中心粒的无定形物质内存在的蛋白质组分，但是现在来讨论这些蛋白的确切功能还为时尚早。

植物纺锤体与动物纺锤体的另一个区别就是几乎没有星体微管。星体微管是从纺锤体极部后端辐射出来的，穿过原生质与动物细胞质膜相连，起到纺锤体的定位和导向作用。动物细胞的星体微管在细胞质分裂期，在缢缩环的定位、形成和细胞质分裂等方面

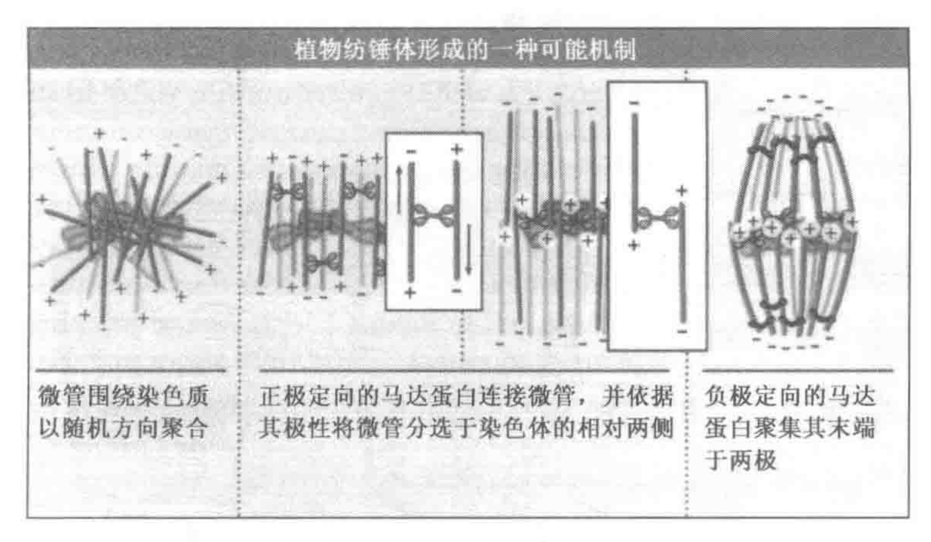


图 17.17　体外实验表明，染色体和两种不同类型的微管依赖马达蛋白，二者之间联合作用的微管成核作用可在没有中心体的情况下形成一个具有两极的有丝分裂纺锤体。将微管分选为正极相对的两组需要一种能结合具有极性相反微管并且可朝向其正极运动的马达蛋白（绿色）。纺锤体两极的形成由可结合两类相同极性微管的向其负极运动的马达蛋白所驱动。

是不可缺少的。这样，可以说在动物细胞是星体微管的作用决定了细胞分裂面。相反，植物细胞的分裂位点甚至在有丝分裂纺锤体形成之前就决定了。星体微管在植物细胞中扮演的角色还不清楚，有可能涉及纺锤体轴的确定。

17.7　细胞分裂的动力学结构复合体在早前期预成的细胞板处构建新的细胞壁

关键概念

- 细胞动力学装置——成膜体——是向外延伸的细胞骨架纤维构成的环。
- 由囊泡定向的两个成膜体环向中线融合形成新的细胞壁。
- 细胞板生长的平面与早前期带的位置一致，而不是纺锤体的中央区域。

在核分裂（有丝分裂）后，细胞质分裂（细胞原浆运动）。在植物细胞中，当新的细胞壁在由早前期带预定的分裂面上形成时，细胞质发生分裂。

细胞质分裂方式在动物和植物细胞中大相径庭，不像有丝分裂那样，两类细胞都涉及纺锤体，它们的细胞质分裂涉及的原理是不同的。在动物细胞中，细胞质分裂涉及一种肌动蛋白环的形成，并通过收缩形成分裂沟，最后将细胞缢缩分裂为二。尽管植物细胞早前期带中也存在肌动蛋白，但这种结构并不收缩而是在细胞分裂前消失。植物细胞的基本结构可能排除了收缩作为一种分裂方式，因为坚硬的细胞壁会阻止细胞发生必要的形态变化。取而代之的是植物利用从细胞内部构建新的细胞壁来完成细胞质分裂。一个膜围成的圆盘——细胞板（未成熟细胞壁的专用名词）在细胞中央形成，并向外生长直到与母细胞壁接合。

细胞质分裂的过程如图 17.18 所示。细胞质分裂开始于细胞分裂晚后期，当刚刚分离的染色体之间出现圆柱状微管束的时候。这种结构叫做**成膜体**，担负着构建细胞壁、

完成细胞质分裂、形成两个子细胞的使命。

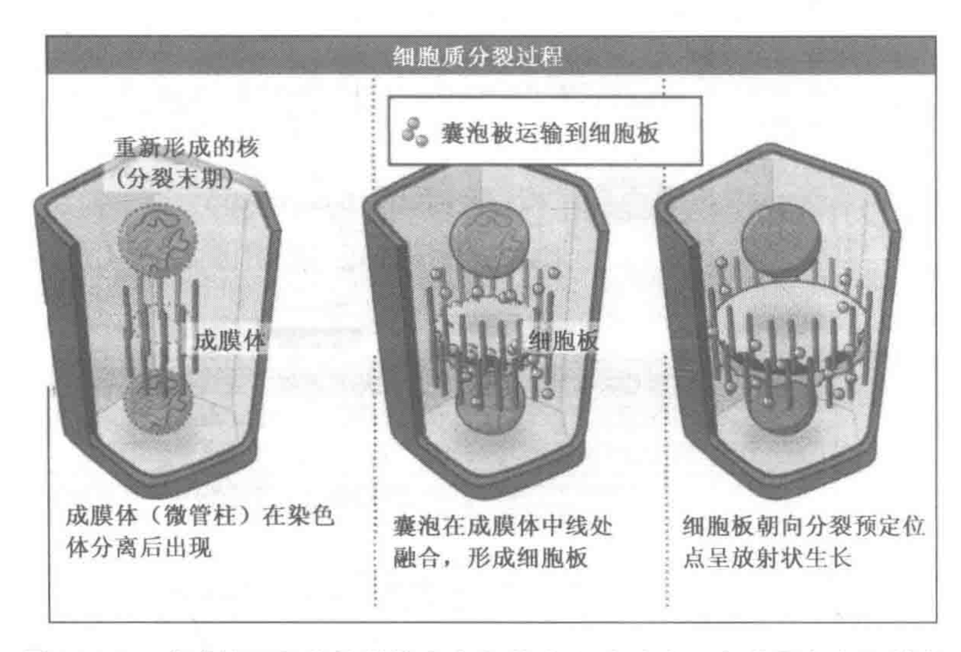


图 17.18　成膜体两部分的微管在它们的中央处重叠。由微管定向运输的囊泡在此积累，相互融合形成细胞板。成膜体起初是位于两个重新形成的细胞核之间的致密微管柱，但其随着细胞板变大而扩展，所以囊泡总是被运输至细胞板边缘。

在一些细胞类型中，成膜体似乎由有丝分裂纺锤体的残体组装而成。而在另一些特殊的细胞类型中，需要几天时间有丝分裂的细胞质分裂才能完成，这些细胞的成膜体由相对方向的细胞核表面散射出来的新形成微管组装而成。像有丝分裂纺锤体一样，成膜体（不要与成膜粒混淆）由相反方向的两套微管组成，它们的正极在两套染色体的中间位置重叠。位于微管间的是指状内质网小管，在微管间也发现微丝纤维并表现出极性。囊泡沿着两套微管向下移动到达微管的正极端与膜融合；在这里囊泡中的细胞壁前体物质与膜开始构建新细胞壁和质膜，最终将两个子细胞分开。图 17.19 显示一个正在分裂细胞的细胞板形成区域，许多囊泡已被运送至分裂面但是还没有开始融合。

成膜体的结构可以指导新细胞壁的形成。囊泡仅在来自成膜体两个部分微管的正极端交汇处的狭窄区域融合，使得新形成的细胞壁呈扁平的圆碟状（因此它被称为“盘”）。当碟子周围的囊泡沿着其圆周融合后向外呈放射状生长。随着碟子直径的不断增长，起初的成膜体微管束展开成圆柱状。伴随细胞质分裂的进行，圆柱体继续膨大，使微管总是在增长着的细胞盘的边缘。初看起来，微管圆柱体是因为新细胞盘的增长而被动地变宽，似乎微管没有必要再保持活性去履行自身的功能。但是，实际上凝固微管活性的药物抑制了新细胞盘的生长，这揭示出微管必须保持活性才能维持细胞盘的增长。看起来应该是微管在细胞盘的中央解聚，因为该区域不再需要囊泡运输；与此同时新的微管在细胞盘边缘再聚合。

成膜体的关键特征是一个对称结构，此结构中细胞骨架组分的特性被用于确定中间线，即通过囊泡融合而形成新细胞壁的平面区域。下一节中，我们将要探讨膜和细胞壁分子在这一过程中的作用。

现在，我们已经知道植物细胞是如何完成有丝分裂和细胞质分裂过程的。应该能理

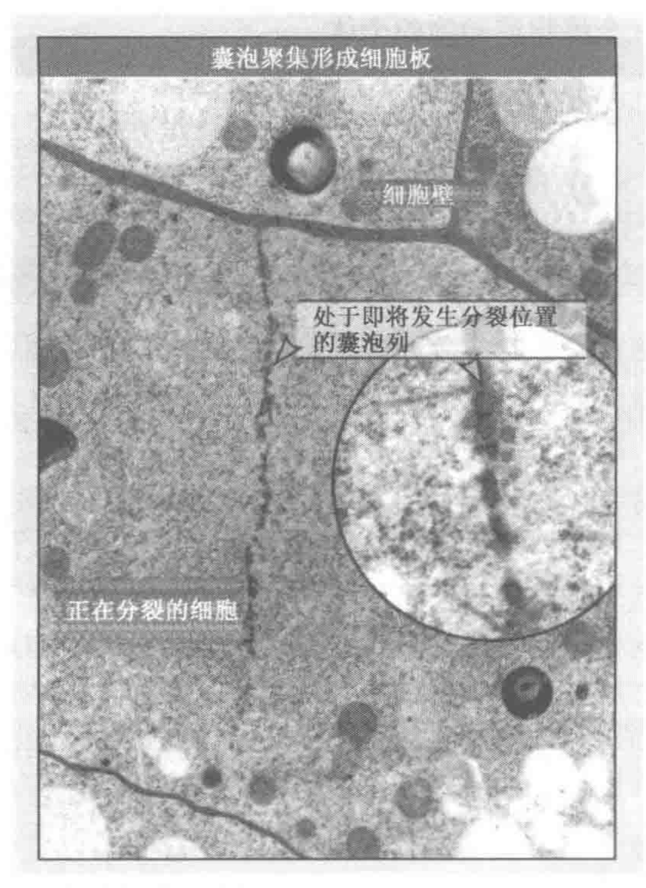


图 17.19 分裂细胞构建细胞板的电镜照片。大量的囊泡聚集在即将发生分裂的平面上，但是大部分还没有融合形成细胞板。插图示一列囊泡的放大形态。照片由 Colorado 大学的 T. H. Giddings 和 L. A. Staehelin 惠赠。

解二者的连接过程和定位控制与动物细胞机制的不同。在动物细胞内，胞质分裂的缢缩沟是由有丝分裂纺锤体定位的，一般与纺锤体轴成垂直；如果不是这样的话，后果是灾难性的。纺锤体轴的精确定位由星体微管和质膜相互作用所控制。植物细胞的结构与分裂过程的关系有几方面的不同。首先，植物细胞的分裂面的位置是在有丝分裂纺锤体形成之前就预定了的，所以纺锤体对此没有作用。其次，是植物细胞核而不是纺锤体移动到将要发生分裂的预定位置。第三，纺锤体的方向与新细胞壁之间的联系不像动物细胞中那么紧密。在有丝分裂的植物细胞中，有时候纺锤体轴和早前期带所确定的分裂面并不是垂直的，并且中期的染色体排列面也在相对于分裂面有些倾斜的位置。这并不能造成任何差别：尽管新的横向细胞壁以相对倾斜的方式开始增长，但是随后便更正自身的生长，回归到早前期带预定的位置。总之，这些区别揭示出动物细胞和植物细胞调节核分裂和细胞质分裂的不同方式。

尽管存在区别，这两种机制的共同点是：纺锤体的定位是通过细胞骨架和细胞质膜层的相互作用实现的。在动物细胞表现为纺锤体星体微管的直接作用，植物细胞中则表现为细胞骨架组分的间接作用，可能是微丝和微管纤维二者构成细胞核与质膜的联系，并进行细胞核的移动引导细胞核分裂。细胞质膜表层在细胞分裂的宏观调控过程中起着尤为重要的作用，因为它使来自于细胞外部的影响因子发挥作用，决定分裂方向、确定分裂所产生子细胞的相对大小。如果没有细胞质膜表层的作用，就不能在空间上调控细

胞分裂使之发育成为一个植物或动物的个体。

17.8 胞质分裂期的分泌物形成细胞板

关键概念

- 整个胞质分裂期高尔基体连续产生分泌囊泡。
- 这些囊泡融合形成与沿着新细胞质膜成一线形的细胞板。

成膜体引导的膜融合是细胞质分裂的一个重要过程。囊泡融合可为行将分开两个子细胞的新细胞壁和沿着新细胞壁新形成的细胞质膜的构建提供材料物质。本节将更详细地分析囊泡融合过程，以及它们形成细胞盘的方式。

来自高尔基体、沿着成膜体微管运动的囊泡承载着构建细胞壁的前体物质的运输，它沿着成膜体的微管移动。当囊泡融合时，细胞壁前体物质释放出来用于构建位于细胞盘内的初生细胞壁。新生细胞壁与已有的成熟细胞壁在组成上是不同的。新生壁主要由胼胝质组成，而老细胞壁主要由纤维素组成；胼胝质是一种较相对刚硬的纤维素更柔韧的碳水化合物聚合体。胼胝质像胶状物质一样具有粘连性，赋予正在增长的细胞壁比形成了的横跨两个子细胞的细胞壁更大的柔韧性。虽然胼胝质是细胞板的主要组分，但却不像细胞壁的其他组分那样直接包装在囊泡运输而来，因为在囊泡中检测不到胼胝质的存在。一般认为，这种聚合物是在位于细胞盘的原生质膜上直接合成的。因此，囊泡通过与新细胞壁的融合承担三种运输功能：

- 掺入细胞壁的非胼胝质成分
- 沿着两个子细胞合成新细胞质膜所需要的物质
- 膜结合的胼胝质合成酶

动物细胞中，专一的中心高尔基体在核分裂开始时裂解，当细胞质分裂结束后重新形成。与此不同的是植物细胞有众多的小高尔基体，分散存在于细胞周期的各个时期的细胞质中。这些高尔基体对于新细胞壁的构建和整个分裂期囊泡的持续分泌都是必要的。有几种机制可确保在胞质分裂期高尔基囊泡只被运输至细胞板。一种机制涉及如何将特定的融合分子合并到高尔基囊泡的膜中。并合酶 KNOLLE 的表达被严格限制在细胞周期的这一时期，确保囊泡只能与分布在细胞板区域的新生质膜而不是固有的母细胞质膜融合。一旦囊泡被运至成膜体中两套微管相遇的狭窄区域，一种类动力素蛋白——成膜素，将囊泡挤压成伸长的细管并辅助它们融合。通过这种方式，膜的细管和囊泡的聚集物在成膜体中线处形成，并随着新囊泡的到达在边缘处向外延伸，如图 17.20 所示。结果是在两个重新形成细胞核的正中间，形成一个含有细胞质膜成分的不断延伸的碟形细胞板。朝向碟子的中心位置，在向外移动的成膜体微管的增长点，持续的膜成分融合使之不断加固形成一个胼胝质支持的由小管组成的网状体。最终，管网体进一步融合形成一个初步完整的细胞板。因此，膜融合的梯度是从细胞板外围到中心逐渐减少，在细胞板外围膜融合最活跃。同样，细胞板的中央是已形成的老区域，而新形成的区域在其外部的边缘部分。

细胞质分裂的最后阶段如图 17.20 所示。位于两个子细胞之间的细胞板转化为细胞壁的过程开始于正在延伸的细胞板边缘的质膜的指状小管与母细胞质膜的融合。通常是成膜体的一侧与母细胞质膜首先接触，因此融合从一侧开始，经过其他区域持续融合到

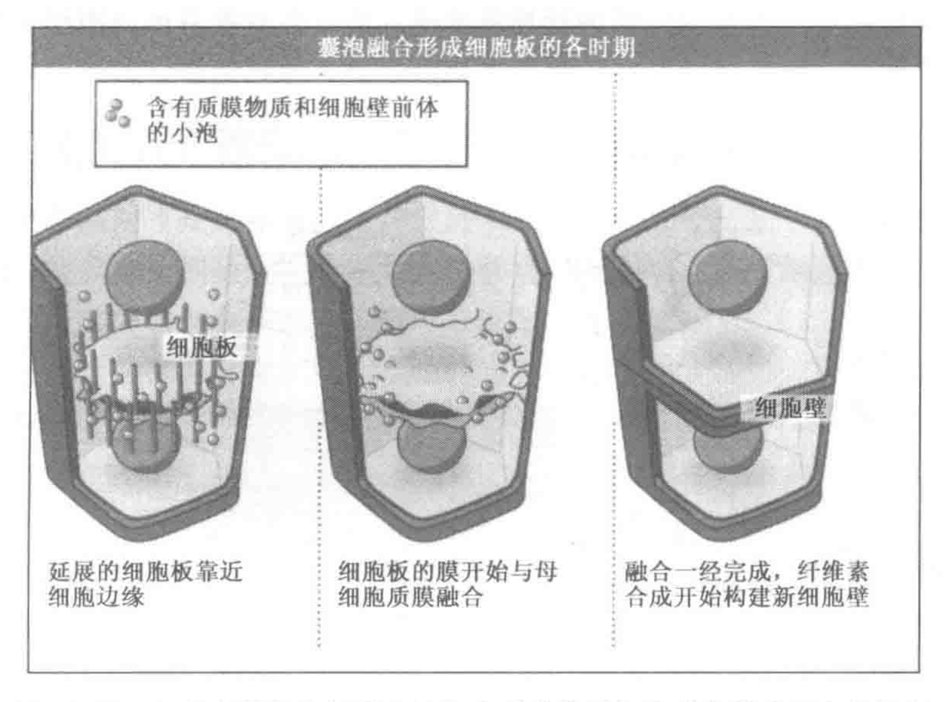


图 17.20　生长中的细胞板膜和母细胞质膜将子细胞融合导致两个新细胞形成。在胞质分裂的起始阶段，由胼胝质聚合物形成的柔韧细胞壁分离，此时细胞壁缺乏纤维素的强度。纤维素的合成强化了新形成的细胞壁并使其转化为成熟的细胞壁。

达另一侧质膜表层。细胞板增长期间，由于胼胝质的连续的柔韧性使之能弯曲或呈现波浪状。但是不管怎样，在增长的最后阶段，细胞板被拉平变直，并且呈垂直方向与原有的细胞壁接触并直接延伸，横跨整个细胞。整个过程可能由细胞骨架组分引导。随着纤维素的沉积，提供一个正常初生细胞壁的坚硬成分，横跨细胞的完整细胞壁在随后的细胞时期中不断成熟。

17.9　胞间连丝是连接植物细胞的通道

关键概念

- 原初的胞间连丝是原浆运动时在细胞壁上形成的孔。
- 胞间连丝连接细胞成为多细胞单元，称为合胞体，信号转导在此发生。
- 胞间连丝可以开放或关闭，它们的孔径能被病毒扩大。

细胞板的形成并没有使细胞分裂产生的二个子细胞完全分开，称为胞间连丝的孔道（单数形式，plasmodesma）依然存在于新形成的细胞壁上，进行两个姐妹细胞质间的物质运输。

细胞质分裂期间，当内质网膜（ER）的小管被束连于形成的细胞盘时，形成胞间连丝，如图 17.21 所示。细胞板的膜与束连的内质网膜没有彼此融合，留下被质膜小管环绕的内质网膜片段，在两个子细胞质膜间保持连接。在质膜小管和内质网膜之间是一薄层环状的细胞质，连接着细胞间的细胞质。这三个组分共同形成的通道就是一条胞间连丝。细胞质分裂期间形成的胞间连丝被称作“初级”胞间连丝。其实还存在第二种胞间连丝的产生机制，因为在非同一次分裂产生的子细胞间也发现了胞间连丝。“次级”

胞间连丝的形成起始于两个细胞间的壁局部变薄，而且肯定涉及内质网用某种机制插入细胞壁以产生通道。

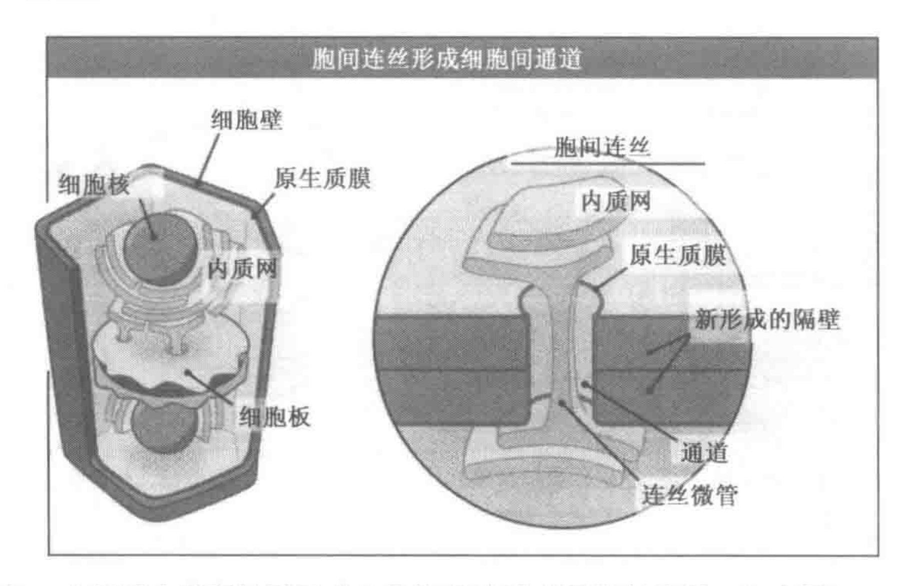


图 17.21　内质网小管穿过已形成的细胞板就形成了胞间连丝（如左图）。一个成熟的胞间连丝（右图）具有穿过连接两个细胞通道中央的内质网小管（连丝微管）。两个细胞的质膜连续地分布在整个通道边缘。分子能够通过细胞壁通道的连丝微管穿越两个细胞的原生质。

胞间连丝将许多细胞的细胞质连接成一个独立的巨大区域称为共质体，如图 17.22 所示。在共质体内，胞间连丝允许电信号传导和水溶性小分子不受限制地运动。一些信使 RNA 和蛋白质也能在细胞间运送，但不是所有的大分子都能穿过胞间连丝。不管怎样，特殊 mRNA 和蛋白在胞间运输的调控可能在发育期间起到决定细胞命运的作用。细胞间大分子物质的运动很可能是通过调节胞间连丝的孔径来控制的。

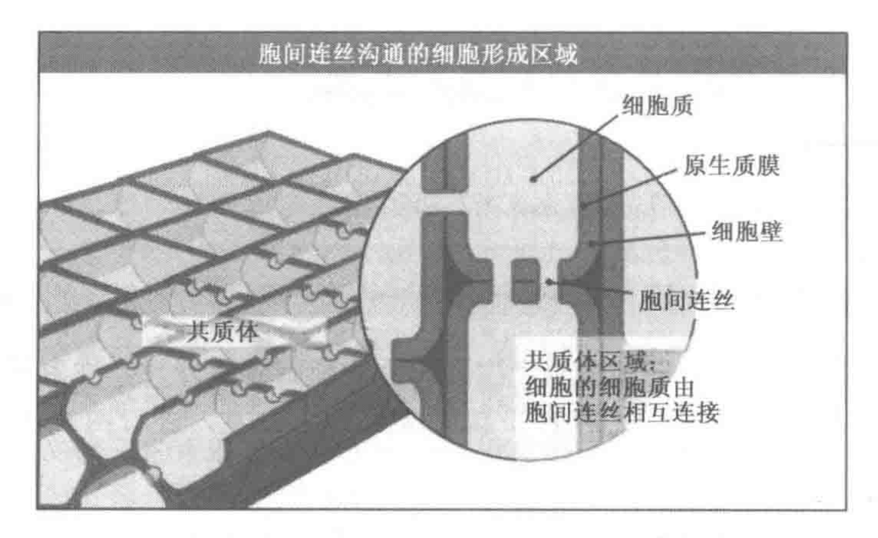


图 17.22　胞间连丝将细胞（图例所示）连接成分享细胞质的一组细胞（合胞体）。在合胞体内的物质能从一个细胞运送到另一个细胞，却不能运至该细胞组以外的任何细胞。这样的连接允许植物体内同一区域内的细胞具有共同的特性。

分子可能由肌动蛋白纤维运送至胞间连丝。胞间连丝集中于细胞壁的末端，此处也

是细胞骨架肌动蛋白微丝的聚集点。我们将在17.17 微丝纤维形成网络以在整个细胞内进行物质运输中叙述，微丝纤维形成一个非常活跃的物质运输系统，在具有液泡的植物细胞中进行长距离运输。植物细胞的微丝结构中，最突出的是从细胞一端到另一个细胞的末端的微丝纤维束，它们被锚定在细胞壁末端，可能由于植物特有的肌球蛋白集中在这里。微丝束和胞间连丝可能共同作用促进了细胞间的分子转运。总体而言，由微丝束带动的细胞质流促进从细胞一端进入的物质移动到另一端，并被胞间连丝运至另一个细胞。尽管没有证据表明巨大的微丝束自身通过胞间连丝从一个细胞到另一个细胞，但有迹象表明胞间连丝的孔内含有较细的微丝纤维和肌球蛋白分子。有假说认为正是微丝纤维和肌球蛋白分子的收缩活性改变胞间连丝的孔径大小，因此调节细胞间的物质流动。

许多植物病毒恰恰利用了胞间连丝提供的细胞间的连接。尽管体型巨大，病毒却能够通过胞间连丝快速地通过一个细胞到达另一个细胞，如图17.23所示。这是可能的，因为植物病毒表达一种“移动蛋白”，能使比通常情况下大得多的颗粒通过胞间连丝。这些蛋白的作用机制还不清楚。烟草花叶病毒表达的一种蛋白就能与内质网结合，使得内质网被修饰后与微管和微丝纤维一起在病毒侵染后成为生产运输病毒的工厂。因此，病毒接管了宿主细胞的合成和运输系统，增大胞间连丝的孔径，使侵染向邻近细胞蔓延。

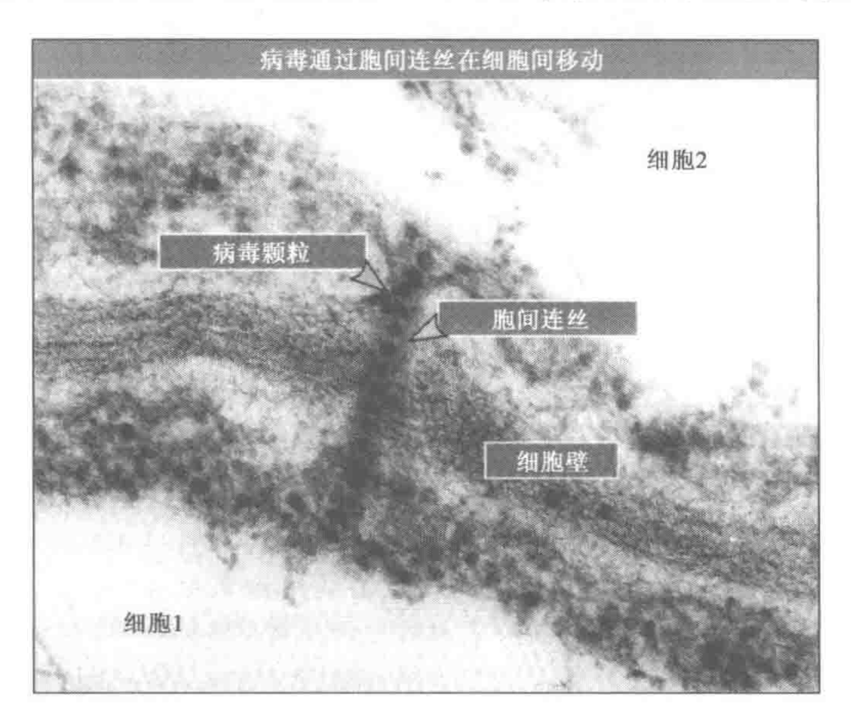


图 17.23　电子显微镜照片显示豇豆花叶病毒颗粒正在通过连接两个叶片细胞的胞间连丝而移动。两个细胞都有大液泡，位于图左下侧和右上侧的无特征区域。每个细胞沿着细胞壁的内侧都有一层细胞质。病毒颗粒在下方细胞的胞质中呈浓密染色的黑点，并排列在胞间连丝内，揭示出侵染过程是从下方细胞向上方细胞蔓延的。照片由 John Innes 中心的 Kim Findlay 惠赠。

17.10　细胞膨大由液泡膨胀所驱动

关键概念

- **液泡吸收水分提供了一个压力驱动的独特细胞膨胀机制。**
- **液泡不只有一种类型。**

到目前为止，我们只是专注于发生在顶端生长点区域的有丝分裂和细胞质分裂过程。当细胞停止分裂后会是怎样？其中最明显的改变就是细胞体型的增加巨大，在这一变化中液泡发挥了重要作用。处在分裂区的细胞相对较小，最多也就含有几个小的液泡，有些细胞甚至根本没有液泡。细胞离开分生区后进入伸长区，在此细胞通过将水分吸收到中央液泡的机制使自身体积膨大。这种膨胀过程涉及三个协同的步骤：①液泡的增大提供生长动力；②细胞壁有限度的松弛允许细胞膨胀；以及③液泡膨胀力的疏导，使之带动细胞沿着特定的方向延伸。在阐述细胞壁作用之前，我们先探讨液泡在细胞膨胀过程中的作用。

液泡驱动细胞膨胀的能力依赖于细胞的一个最基本的物理特性。细胞依赖于阻碍物的存在使其内部物质与外部环境分隔开来，使得细胞能专注于代谢反应，并且这些反应在不受外界胁迫的稳定条件下进行。事实上，植物和动物细胞都被富含脂质的界膜所包围。大分子和带电分子不能自由穿越界膜，因此能够在细胞内积累浓缩。但是水和小的、不带电分子可以通过渗透作用透过细胞膜。渗透作用是水穿过类似细胞膜这样的半透膜的过程，驱动力源自膜两侧溶质浓度的不同。水的净流动方向是从溶质浓度低的一侧到浓度高的一侧。通过浓缩环境中的盐分和自身合成其他分子，细胞在细胞质和外界基质之间建立起渗透压差，由此引起水分的流入来消除这种差异。水的流入会使细胞处于“水分泛滥致死”的危险，因为细胞溶质会被稀释而最终导致细胞胀破。为了防止这种情况发生，动物细胞不惜消耗能量持续地将钠等离子泵出细胞，以降低细胞内溶质浓度减少水分进入。植物细胞则用一种完全不同的策略应对这个问题，并且利用水的流入驱动生长。

植物将细胞吸收的水分储存在液泡中。通过主动从环境中吸收、积累无机盐，液泡能利用渗透作用进一步吸收水分，使细胞体积显著增大。细胞停止分裂并充分延展后，中央大液泡能占到细胞总体积的95%，如图 17.24（见图版）所示。毫无疑问，液泡是植物细胞最大的细胞器。液泡被自身的膜——液泡膜所包裹，增大后的液泡挤占细胞质的空间使其成为细胞质膜下的一薄层。液泡中大部分成分是水和简单的无机盐，因此通过形成液泡来增大细胞体积是一种经济、高能效的方式。

液泡对于植物细胞体积增大是必需的，除了简单地占据空间外，液泡还有其他功能。液泡常被用于隔离小分子，这些分子或许是细胞储存以便日后利用，或许需要永久地与细胞质隔离。一些来自环境的有毒化学物质要在细胞中分解掉或者将其隔离储存在液泡中起到解毒作用。另外，植物自身产生用于防御微生物的有毒化学物质也可以储存在液泡中。一些植物有色组织的色素也沉积在液泡中。不管怎样，并不是所有储存在液泡中的物质都需要长期隔离。液泡也能起到有用物质的临时储存库角色，例如像无机离子和氨基酸。

另外的液泡成为一些不能在细胞质中进行的生物反应的场所。比如，含有细胞溶解和消化酶的液泡，与动物细胞溶酶体和酵母液泡类似，负责将代谢物降解为细胞可以利用的组分。有一种情况，在种子中储存和消化溶解作用的液泡共同发挥功能。也有一种植物特异性的液泡，具有积累和储存蛋白的特殊功能。成熟后，这种液泡充满了一种或几种很高密度的特殊蛋白质。种子开始萌发时，蛋白储存液泡与溶解性液泡的融合可以使蛋白质降解，释放出的氨基酸被用于植物生长早期阶段的蛋白质合成。

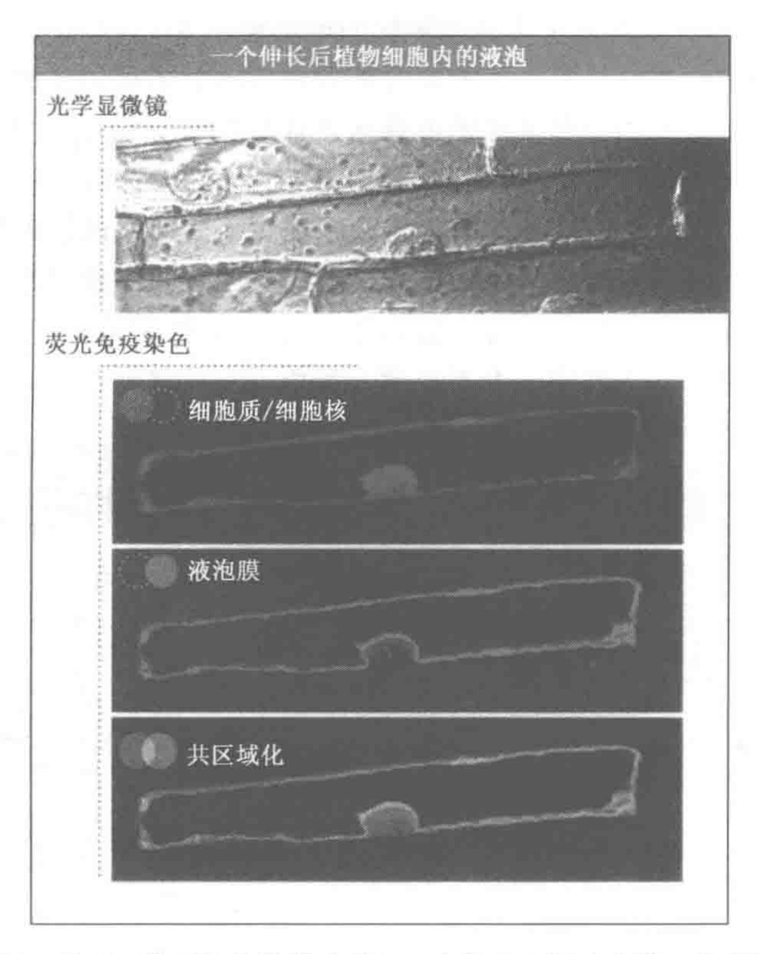


图 17.24　最上面的照片显示根或芽中一个完全伸展的细胞。细胞核是位于下层膜中央一个可见的半圆环。下面的照片是同一个细胞的照片，显示利用荧光探针标示的原生质和细胞核（红色）区域，以及液泡膜的位置（绿色）。占据细胞内大部分空间的非染色区域是液泡。照片由 Sebastein Thomine 和 the Cell Imaging Facility(http://www.ifr87.cnrs-gif.fr/pbc/imagerie/contact.html)惠赠。

17.11　膨压的巨大压力由细胞壁内的强力微纤维所抵挡

关键概念

- 植物细胞壁主要是碳水化合物，而不像动物细胞具有含蛋白质的细胞外基质。
- 非随机排列坚硬的纤维素微丝限制细胞膨胀产生的压力。
- 蛋白质松弛细胞壁以允许细胞膨大。
- 每一层的纤维素微丝方向是可以改变的。

植物细胞因为具有细胞壁，能够承受来自膨胀液泡的压力。要具有这种能力，细胞壁一定要有异常的强度。不但要坚硬，而且细胞壁也必须有能力满足细胞膨大和伸长。细胞壁结构的细节揭示了这些特性的来源，也阐明了细胞壁如何能够调控细胞膨胀的特定方向以产生伸长的细胞。

植物细胞壁比动物细胞外基质更厚、更结实。后者主要由蛋白质构成，但是蛋白质只占植物初生细胞壁成分的10%左右，主要是糖蛋白、细胞壁形成所需的酶，以及像伸展蛋白这样参与细胞壁构建的蛋白质。初生壁大部分（大约90%）由源自于大气中

的 CO_2 通过光合作用合成的碳水化合物转化的聚合物构成。

细胞壁的基本组分是纤维素，一种葡萄糖残基末端与末端相连的直链聚合物。每条链上间距整齐、数目巨大的羟基基团使得许多条同样的分子链以氢键相连、并肩排列，形成的一种线性、半晶体结构称为微纤丝，如图 17.25 所示。这些纤维素组成的微纤维是植物细胞壁的主要结构组分。图 17.26 展示了成为一体的彼此排列紧密的纤维素微纤丝。高氢键结构赋予微纤丝硬度和巨大的强度——其拉伸强度超过钢铁——正是这样的拉伸强度提供给细胞壁非凡的坚韧性。像植物一样，人类也利用纤维素的特性：木材、棉花、纸张和硬纸板都是主要由纤维素组成，利用了它的坚硬性和柔韧强度。

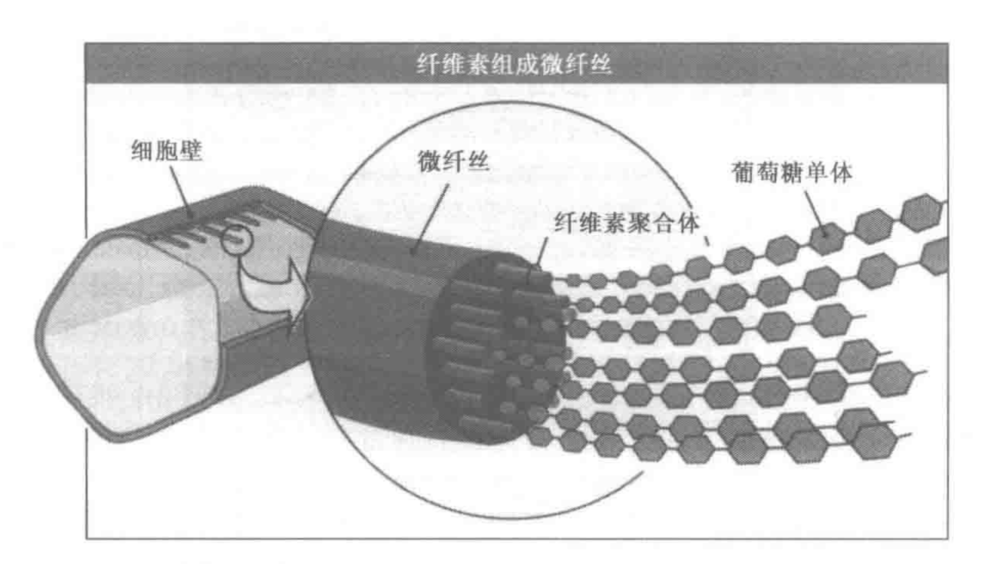


图 17.25　纤维素单体紧密排列在一起形成的微纤丝是细胞壁的基本结构组分。微纤丝内所有纤维素单体有同样的方向，它们之间存在广泛的氢键连接。这些连接使得微纤丝坚硬而富有韧性。

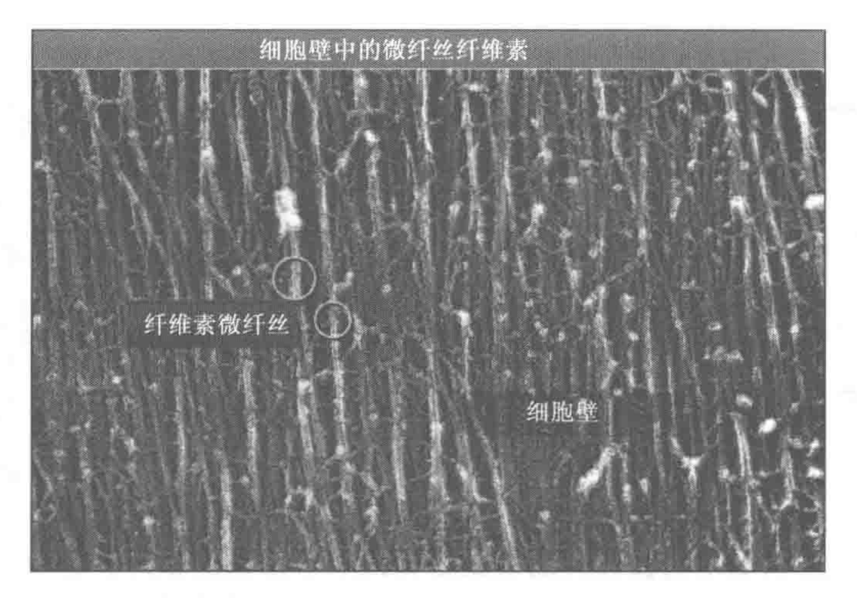


图 17.26　细胞壁的电子显微镜照片。微纤丝直径大小稳定，呈显著的索状从顶端延伸至底端。它们之间的连接清晰可见。照片由 Brian Well S. 和 Keith Robert S. 惠赠。

除了纤维素组成的微纤丝，细胞壁还含有许多其他组分。图 17.27 展示了细胞壁的基本组成结构。微纤丝与另一种形式的碳水化合物聚合体——交叉耦联多聚糖（也被认为是半纤维素）——交联在一起。这些聚合物由氢键连接成一张纤维网，分布在整个细胞壁。围绕这个交联纤维结构核心的是另一类复合碳水化合物的成员——胶质。胶质的分支结构导致高度的水亲和性，围绕纤维素形成凝胶状物。胶质形成凝胶的倾向很容易想象，因为胶质是多种水果制作的食用果酱中起凝结作用的组分。细胞壁内的凝胶允许水和小分子的扩散，但阻止大分子物质的运动。胶质结合像钙这类阳离子，可使凝胶硬化加强细胞壁的强度。

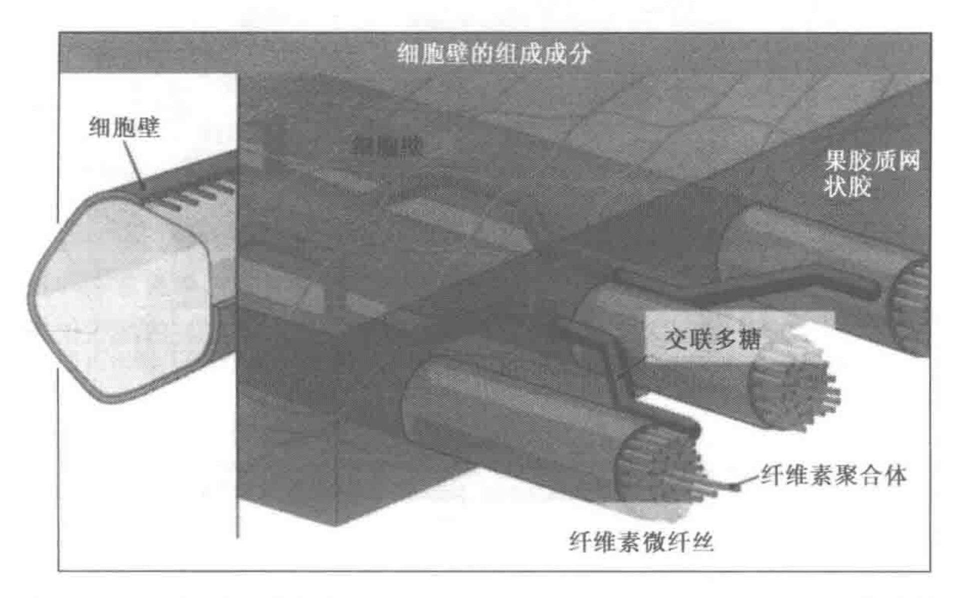


图 17.27　细胞壁内微纤丝的广泛连接，合并成一个大单元。交联多聚糖连接相邻的微纤丝的全长，而且两种组分都包裹在连续果胶质分子网形成的贯穿细胞壁的凝胶中。

纤维素赋予细胞壁的巨大强度使植物细胞能经受液泡膨胀所产生的压力而免于破裂。液泡向外的压力和细胞壁的抵抗作用使细胞内溶物处在一个内在的压力中，称为膨压（也常称为膨胀压）。膨压可以非常高，在一株园艺植物例如郁金香的细胞内膨压（0.6 MPa）比汽车轮胎内气压（0.2 MPa）高出几倍，有些植物的细胞内膨压甚至超过 3MPa。膨压扩大了细胞，使细胞壁变得紧绷导致细胞坚硬。这种硬度用来支撑植物的许多部分；膨压对非木本植物直立生长的重要性是非常明显的：因为如果得不到浇灌，它们会萎蔫而难以保持挺立。

膨压是一种等方向性或无方向性的力。当置于纯水中，一个除去细胞壁的细胞（称为“原生质体”）将如气球般等方向性膨胀，直到胀破。细胞可以利用膨压来伸长，但要这样做就必须构建完整的细胞壁。图 17.28 显示细胞壁由几个同心层面——称为薄层——当细胞生长时连续铺展。细胞壁中任何一层微纤丝彼此都不交叉，所以每个薄层并非微纤维编织起来，而是由几乎平行的微纤丝组成。如图 17.29 所示，微纤丝的方向决定了细胞膨胀的可能方向。如图中所示，当微纤丝包绕细胞时，侧面的细胞膨胀被阻止。邻近的微纤丝能够彼此分开，使得细胞能够沿着与其垂直的方向膨胀伸长。这就是植物引导生长方向的主要机制。以生长的根为例，在顶端的细胞伸长区，微纤丝定向地使细胞在垂直于根-芽主轴（横断面）方向上伸长。

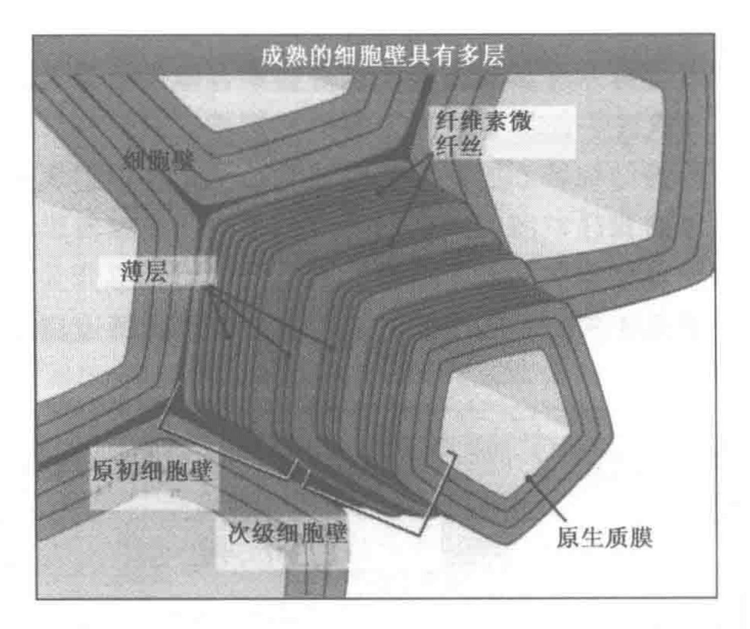


图 17.28　细胞壁含有一定数量的薄层，每层之间是独立的。新层在旧层内形成。最先形成的一层（原初细胞壁）位于最外侧在细胞还在伸长期时就形成了。细胞完全延展后，几层新壁（次级细胞壁）的增长使细胞壁加固。

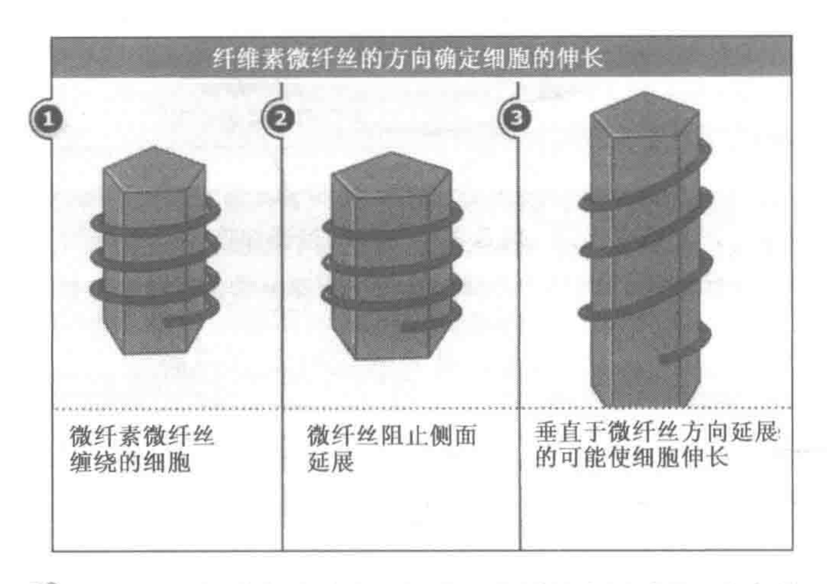


图 17.29　螺旋代表缠绕于细胞上的纤维素微纤丝，它们的方向决定了细胞伸长的方向。

17.12　细胞壁需要松弛和重塑以适应细胞生长

关键概念

- 蛋白质松弛细胞壁以允许细胞膨胀。
- 每层纤维素微纤丝的方向性是可变的。

为了适应植物细胞的膨胀，细胞壁内的多聚物必须能进行相对移动或断裂。尽管细胞壁的纤维素微纤丝可承受拉伸力，但是同一薄层中相邻微纤丝的连接能在受控条件下被分开，使得细胞伸展能以垂直于微纤丝的方向发生。有两个主要的候选者被认为作用

于细胞壁松弛化。细胞延展素（也称细胞壁松弛蛋白）被证明当处于张力下能使纯纤维素层（片纸层）拉伸。细胞延展素被认为是通过非酶促方式，将纸张中紧密排列的微纤丝间的氢键破坏。无论如何，细胞壁不是纯粹由纤维素组成的，细胞壁的纤维素由诸如胶质和交联多聚糖包裹着将微纤丝分开。在植物细胞壁的不同环境下，活跃的细胞延展素“拉开拉链”一样将交联多聚糖和纤维素微纤丝间的氢键打开，使得微纤丝能互相分开，如图 17.30 所示。植物细胞分泌的质子（H^+）被认为促进这一活动过程，因为细胞延展素在酸性条件下活性最大。因此质子的分泌可以被用于控制细胞延展。酸促生长理论暗示植物生长激素正是通过这种方式刺激细胞伸展。

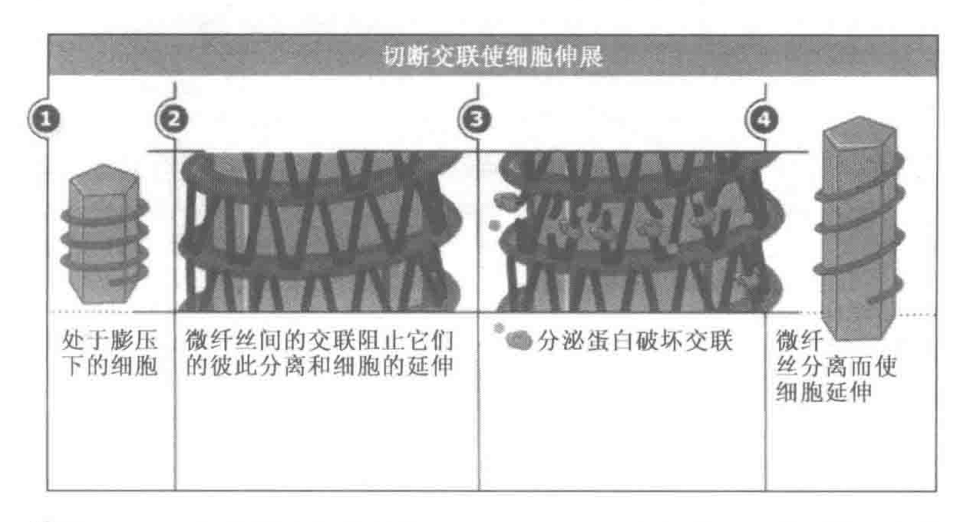


图 17.30　细胞壁内相邻微纤丝间的交联阻止它们分离，进而阻止细胞伸展。分泌蛋白破坏交联而使细胞能伸展。

另一种细胞壁蛋白也被认为在削弱细胞壁、促进生长方面发挥作用。葡聚糖内糖基转移酶具有“剪切和粘贴”功能，通过切断交联多聚糖，将其末端与其他断裂的多聚糖链末端相连，使细胞壁松弛、细胞延展可以发生。这种酶可能伴随着细胞延展而发挥作用。

当细胞生长时纤维素层发生了怎样的变化呢？就像俄罗斯套娃，最幼嫩的细胞壁薄层在内侧靠近细胞质膜，围绕它有几层更成熟的纤维素薄层。但是，与套娃不同的是细胞壁要继续生长。第一个薄层可以围绕着细胞积累，此时细胞还很小，当细胞延展到原来体积的几倍大后，新的薄层被压在下边。当细胞继续延展时，老旧薄层内的纤维素微纤丝不得不发生重排。一个长期存在的观点称为复网生长假说。该假说认为微纤丝起初积累于细胞周围，与细胞延展的方向垂直（或呈一扁平螺旋，像压缩的床垫弹簧）。然后，当新的纤维素微纤丝层取代它们的位置以适应增大的细胞时，被置换的微纤丝在生长力的驱动下重新排列。这个过程很像拉伸一条弹簧，如图 17.31 所示。根据这个模型，微纤丝呈方向梯度变化：那些靠近膜的微纤丝与细胞伸长方向垂直，而那些远离膜薄层内的微纤丝却趋向于与伸长方向平行，位于中间的薄层则存在过渡的倾斜角。

无论怎样，细胞壁的生长看起来比这种模型设想的要更复杂。新的纤维素微纤丝并不总是位于靠近细胞膜、与细胞延展方向呈垂直方向的位置形成。它们可以沉积在不同方向的交互层之间，形成一种十字交叉排布模式，这远非复网生长假说所能解释的。植物生长激素能引发微管和微纤丝方向的移动，这意味着微纤丝的方向受到细胞的主动调

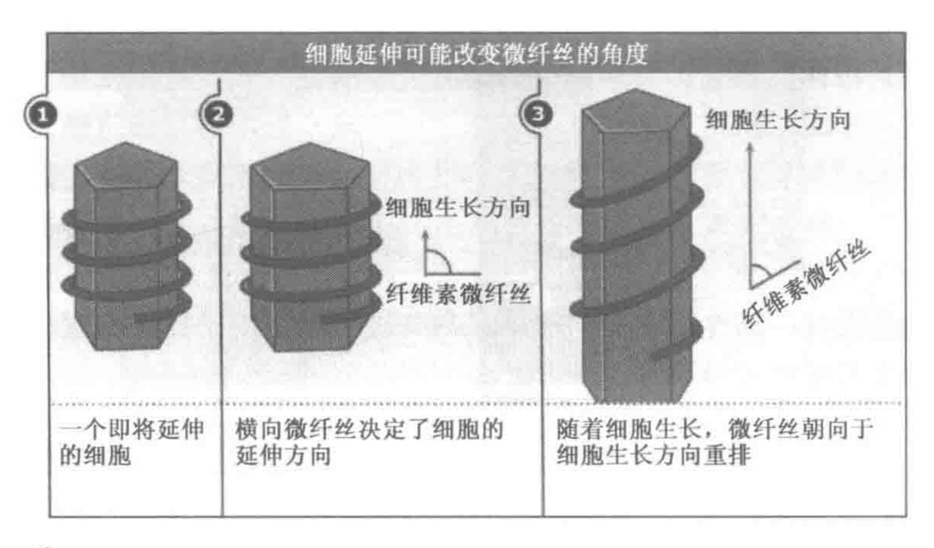


图 17.31 复网生长假说认为随着细胞延展，原有的微纤丝重新取向，朝向细胞延展发生的轴方向。这种重取向与弹簧两端被拉伸时发生的角度改变相似。

控，而不是细胞膨大时引发重排的结果。在细胞壁延展中起重要作用的可能是相邻微纤丝间氢键的断裂，不是老旧薄层中微纤丝方向的改变。

17.13 纤维素在原生质膜合成，而不像其细胞壁组分那样预合成组装后分泌

关键概念

- 镶嵌在质膜内的复合体进行纤维素的聚合。
- 纤维素合成复合体沿质膜表面移动。

我们已经清楚细胞壁对于一个植物细胞是多么的重要，细胞壁成分的组织方式在决定植物如何生长方面发挥重要作用。那么，一个细胞如何构建细胞壁？特别是，细胞壁的中央组分是如何组装的，是纤维素微纤丝赋予壁足够的强度吗？

起初认为纤维素一定是在细胞壁内自身合成，以便当细胞生长时被破坏的微纤丝薄层得到及时修复。现在知道，实际上纤维素由一种多酶体系，即镶嵌在质膜中的纤维素合成酶复合体来进行聚合。纤维素生物合成位点的首次发现得益于冰冻蚀刻电子显微镜技术在植物新细胞壁合成部位的质膜研究中的应用。这项技术能将细胞膜的双层劈裂开，将其中一片置于电子显微镜下观察时，镶嵌于膜内的蛋白复合体呈颗粒状清晰可见。如图 17.32 所示，植物细胞质膜含有许多非常大而呈特定形状的跨膜复合体，它由呈六角形排布的六个颗粒组成。六角形每一个角的“玫瑰花”状颗粒大小与核糖体差不多，含有大量纤维素合成酶的拷贝。图 17.33 展示了这种酶的单拷贝在玫瑰花颗粒中的可能排布形式。复合体在原生质侧吸收活化的葡萄糖前体用于聚合形成纤维素多链，同时所有的纤维素多链不断地被从膜的胞外侧挤压出来。当一个玫瑰花状复合体合成纤维素时在细胞质膜平面内移动，后面拖着新合成的纤维素多聚物，如图 17.34 所示。关于复合体是如何被驱动的，一种观点认为挤压锚定在细胞壁线性多聚物的活动为“玫瑰花”复合体在流动细胞质膜表面移动提供动力。

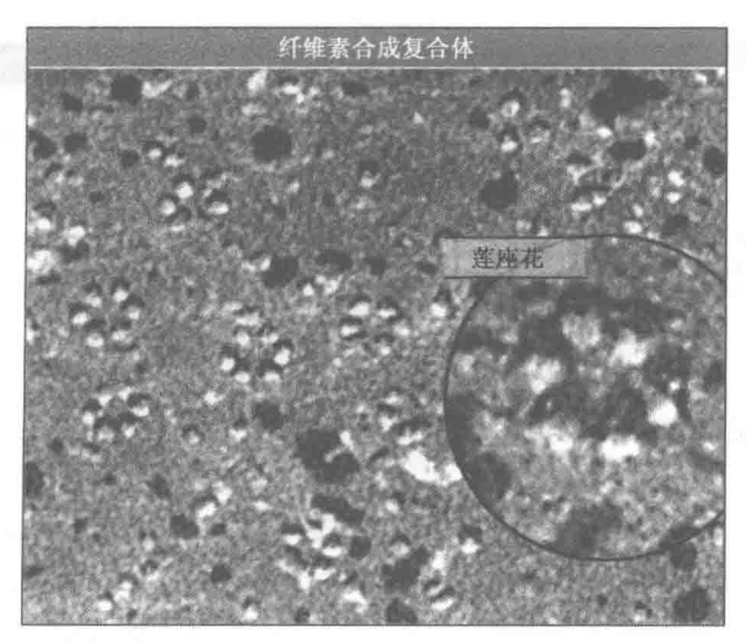


图 17.32　冰冻蚀刻电子显微镜技术显示植物细胞质膜内的镶嵌蛋白。可以看到几个六角形"莲座花"状复合体。放大显示单独的"莲座花"复合体。照片复制自 Haigler，C. H.，and Blanton，R. L. 1996. *PNAS* 93 (22)：12082-12085. Copyright © 1996 National Academy of Science. 感谢 M. Grimson 的技术支持。

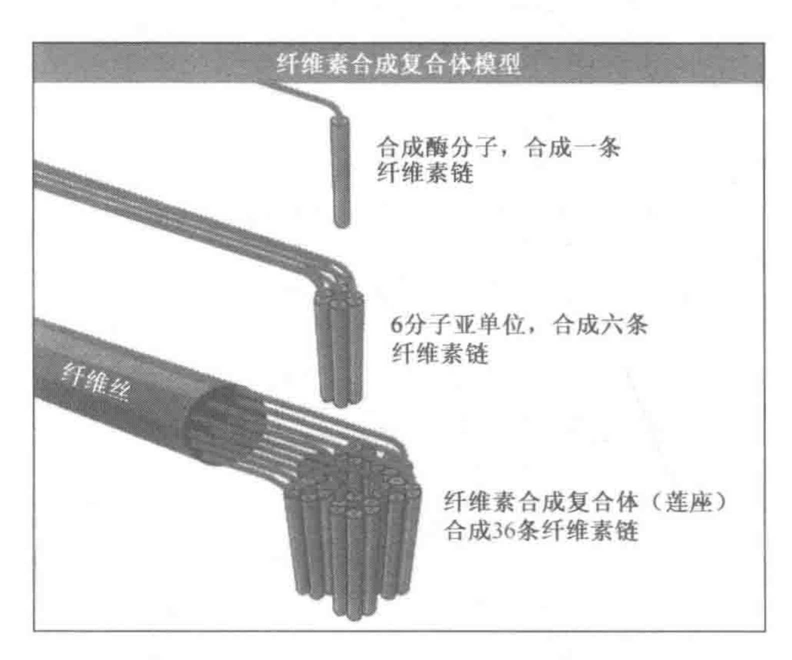


图 17.33　每一个完整的复合体由 36 个纤维素合成酶的拷贝聚合而成。它们的排列方式能使合成的纤维素链组装在一起形成微纤丝。

每一个复合体含有足量的纤维素合成酶，可挤压出 30～50 条纤维素链组成一条微纤丝。这些非分支链以平行的方式包裹起来形成一种线性半晶体结构的纤维素微纤丝。单个的纤维素链只有大约 1～5μm 长，而它们组成的微纤丝长度却超过 100μm（足够环绕大多数细胞），因此单纤维素链的末端一定是沿着微纤丝长轴交错排列的。利用膜结合酶复合体来合成植物细胞外基质中的主要纤维是很独特的，与动物细胞外基质的主要纤维性蛋白——胶原质的分泌方式（胶原质以前体形式分泌，在细胞外表面组装）是完

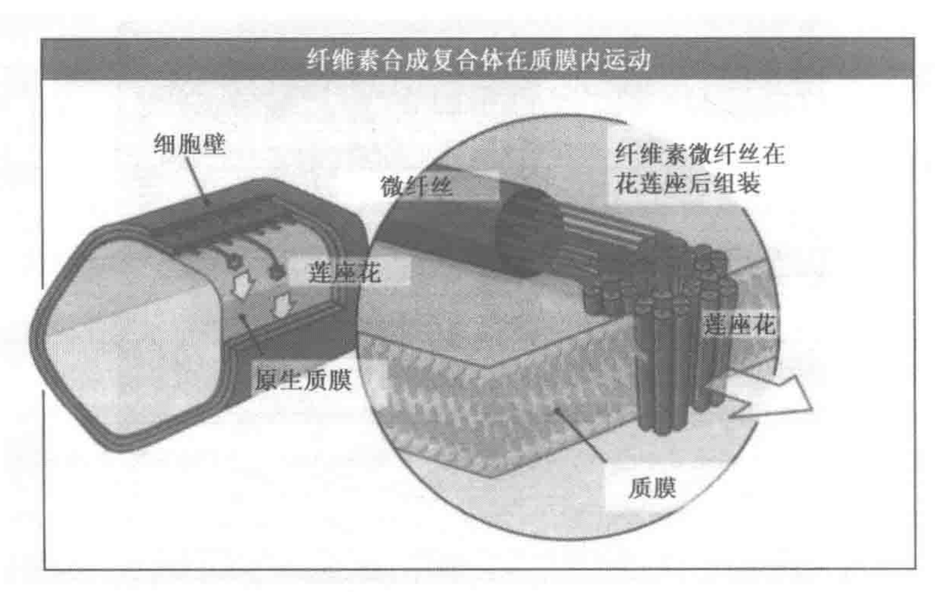


图 17.34　微纤丝在纤维素合成复合体后连续组装形成，随着复合体在膜平面上移动。纤维素单体在离开复合体后相互非常接近，并立即组装形成微纤丝。

全不同的。胼胝质也是直接在质膜上由其自身的合成酶完成。因此除胼胝质外，纤维素的合成与细胞壁其他组分的合成过程完全不同。细胞壁其他组分是在细胞内预先合成组装的，包裹在高尔基囊泡中向外运输，与质膜融合后释放出来。

17.14　原生质表层微管是细胞壁形成的组织者

关键概念

- 植物细胞分裂间期的微管定位于质膜下。
- 表层微管经常与最新合成的纤维素微纤丝协同排列。
- 表层微管可能通过引导纤维素合成和微纤丝组装来组建细胞壁。

我们已经清楚由液泡膨胀产生的非定向力通过纤维素微纤丝的横向切断改变为沿细胞伸长的定向力。微纤丝是如何在细胞表面进行高度有序的排列呢？答案被认为是细胞内的微管组织方式。

不像多数的动物细胞，植物细胞内的微管不是从靠近细胞核的单一位点呈放射状延伸至整个细胞质。间期时，植物细胞微管大部分被限制于质膜的内表面，并与表面平行排布，如图 17.35 所示。每个微管与质膜之间数量众多的连接保证了微管的大部分长度与质膜紧密相连。微管分布在整个质膜，形成一个有序排列的整体，所有的单独微管彼此之间大致是平行的，见图 17.36。质膜表层微管排列的方向也不是随机的，通常是与细胞的活动有关。例如，在将要延伸的细胞中，微管方向通常垂直于延伸的方向以便可以环绕细胞扩展的轴，如图 17.37 所示。除了很多高度有序的表层微管，有些类型的细胞还有从细胞核表面向外发出的微管。它们的功能还不清楚，但不管怎样，正是表层排列的微管在细胞壁的构建中起着重要作用。

当细胞的微管被解聚时，微管与细胞壁组成之间的连接是最清晰可见的。这很容易由一些与微管发生特异性作用的小分子所验证，比如自然界的秋水仙素或者人工合成的某种除草剂。植物根部细胞被这类药物处理后会持续扩张，但只会产生无方向性的膨胀

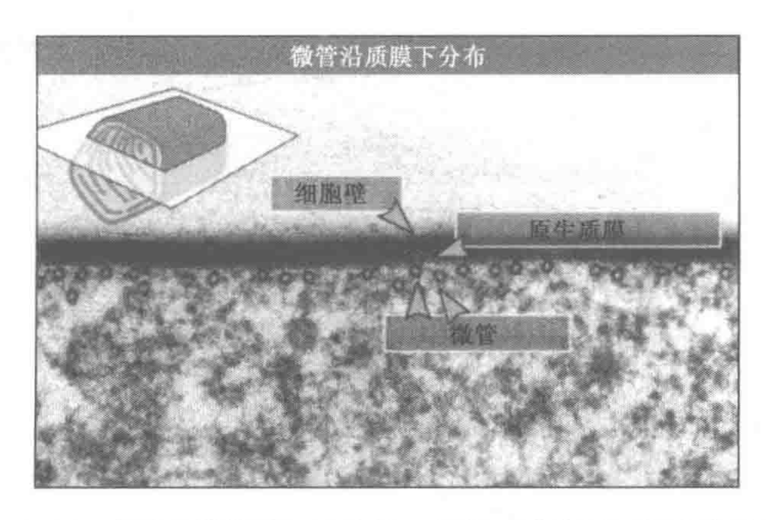


图 17.35　电子显微镜照片显示处于间期时的紫露草细胞穿过膜层和部分原生质的横切图。一层高度有序排列的微管层直接位于质膜下。而原生质中没有其他微管存在。照片复制自 Lancelle，S. A.，Callaham，D. A.，and Helper，P. K. Method for rapid freeze fixation of plant cells. 1986. Protoplasma 131：153-165。

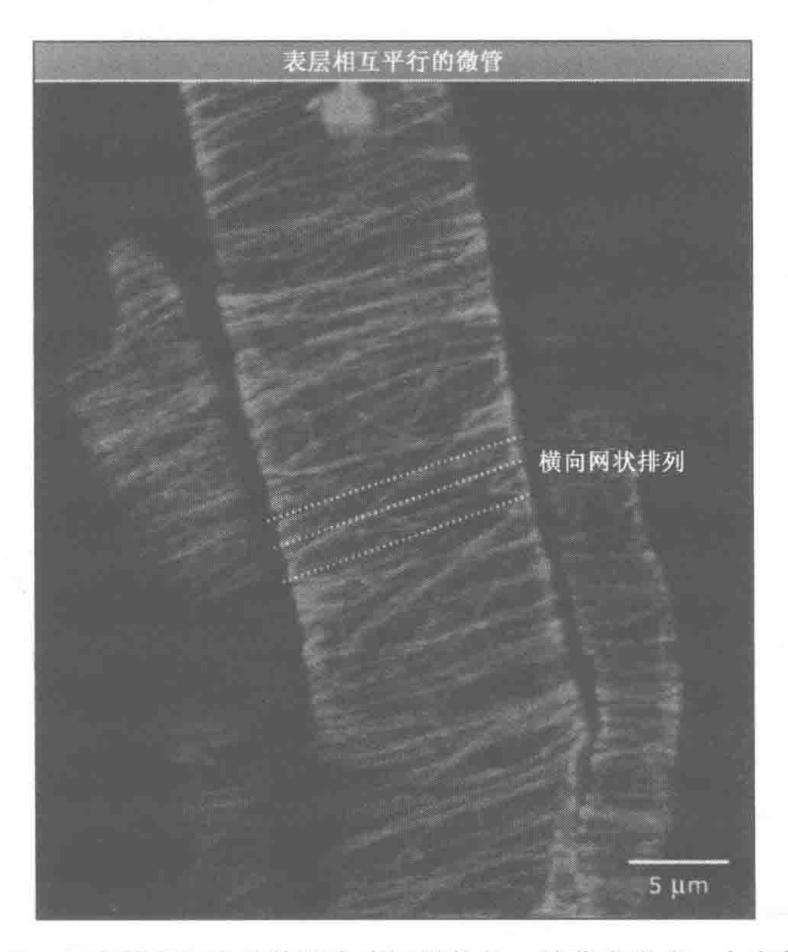


图 17.36　拟南芥细胞中微管蛋白表达微管的一种荧光形式。大多数微管相互平行地环绕细胞分布。照片复制自 Burk，D. H.，and Ye，Z. H. Plant Cell. 2000. 14：2145-2160. Copyright 2002 美国植物生物学家协会。

而失去伸长的能力，其结果是根尖变成无序的细胞团。从细胞水平来分析，造成这个结

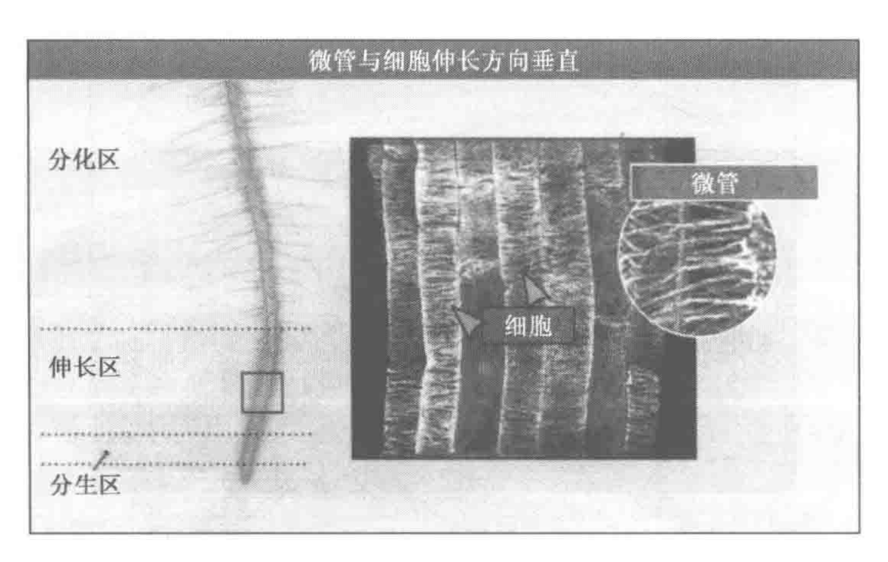


图 17.37　左图显示的是生长中的拟南芥根部。右边方框图显示的是另一株拟南芥根部伸长区的一组细胞。框中染色部分显示了细胞的微管组织，几乎所有的微管排列均与根部和细胞伸长的方向垂直。圆形插图显示细胞中一两个小区域内微管的分布。左图由 Michigan 大学的 John Schifelbein 惠赠，右图由 John Innes 中心的 Keiko Sugimoto 惠赠。

果是由于当细胞内微管被解聚时，提供细胞壁新合成纤维素的能力丧失：药物处理后，新生成的纤维素随机排列，导致细胞无法产生将膨胀转换成伸长过程所需要组成模式的纤维素微纤丝。

那么，微管是怎么影响纤维素组织过程的呢？答案似乎与质膜另一侧的纤维素微纤丝与细胞质微管的装配有关。表层中排列的微管趋向平行于质膜外表面最新形成的微纤丝，如图 17.38 所示。这个现象说明微管通过以某种方式指导新纤维素的合成与装配而起到细胞壁构建模板的作用。为解释什么原因以及如何使微管和纤维素微纤丝平行排列，有两种相关的模型被提出，见图 17.39。一种说法是纤维素合成酶复合体在质膜上沿下层微管形成的狭窄通道运动。然而，该复合体却不能跨越微管自身或通过连接蛋白质构成的微管和膜的系列连接构成的边界。在这个模式中，微管并不帮助纤维素合成酶复合体运动，而只是简单地维持其有规则的自行运动。坚硬的线状的纤维素微纤丝的合成过程推进了细胞质膜中复合体的运动。第二种模式中，微管扮演着更主动的角色，并为复合体的移动提供动力。对纤维素合成酶复合体和微管的荧光标记显示，微管的确为自主驱动的酶提供了运动轨道。然而，目前还不是很清楚微管的作用是直接的还是间接的。

17.15　原生质表层微管具有高度动态性，能改变自身的方位

关键概念

- 植物细胞微管聚合是多位点的。
- 微管聚集成核后可以沿细胞质表层运动。
- 微管结合蛋白将微管组成平行的束。
- 响应激素、重力和光的作用微管的排列可以重新定向。

植物细胞表层的微管为什么会变得如此高度有序呢？回答这个问题，我们需要知道

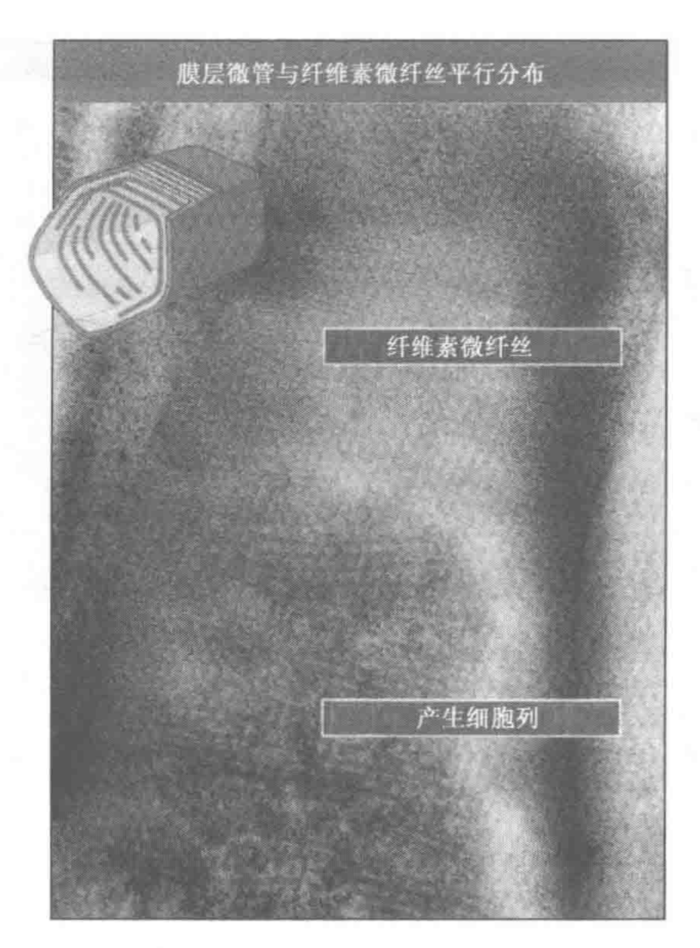


图 17.38 浅层拟南芥根细胞的电子显微照片。从照片的上部到下部显示的是细胞的长轴逐渐穿过细胞壁，进入胞质暴露出微管。膜层的微管相互成束排列，与细胞壁中的一簇簇纤维素平行。照片由 Brian Wells 惠赠。

表层微管的排列是如何形成的，从其中包含的每一个独立的微管怎样产生开始。一个植物细胞并没有像动物细胞中心体那样单一而明显的成核位点，但被认为有很多分散在细胞内的成核位点。微管成核位点的分散似乎与植物细胞由于液泡化增大的体积有关。当可见的微管从细胞核周围放射性地发出时，一些成核所需物质就出现在核的表面。这种现象经常在胞质分裂后发生。然而在很多种伸长了的成熟细胞中与核相连的微管消失了，只有表层的微管依然保留着。因而，此时植物细胞的分裂似乎停止了，细胞开始伸长，微管成核位点已散布在细胞质膜的整个内表面。与这个观点一致的是，分布在表层很多的位点被发现于成核的微管上。这些位点可以在表层上移动，当粘贴在微管的末端时它们已经成核。至少在某些情况下似乎这些位点能释放微管，然后使之整合到表层的微管排列机构中。从这些位点释放微管是与一种称为剑蛋白（katanin，一种 ATP 酶，可使微管切断并解聚）的微管切断蛋白的作用实现的，剑蛋白在植物细胞中的功能是影响表层微管结构的形成。

表层微管不是静态的通道，而是高度动态的。把荧光标记的微管蛋白（tubulin）显微注射至植物细胞后能快速整合到全部的微管结构中，这是由于微管的动态不稳定性，即微管的快速生长的正端产生的快速缩短和再生（见第 7 章微管）。微管在新的方向缩短和再生的能力使微管束可以作为一个整体来探索其不同的构造。不管怎样，植物

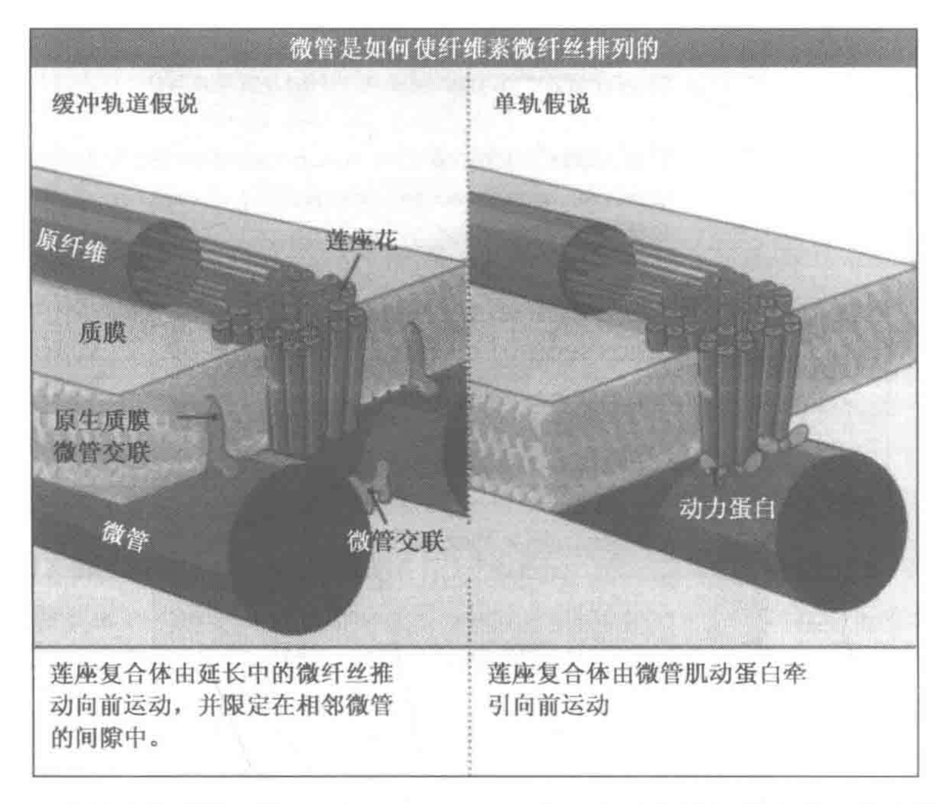


图 17.39　在缓冲轨道模型中，“莲座花”结无法穿过表层微管与其在膜上的连接点构成的边界，被限制在相邻微管间的通路内移动。由于膜层微管的封闭空间，“莲座花”结与新形成的微纤丝排列得非常紧密。而在单轨模型中“莲座花”结只能简单地被微管依赖的肌动蛋白牵引沿微管向前运动。

微管不是附着在中心体，这样微管额外的自由负端能够向质膜的内表面移动。在踏车现象中（treadmilling），微管负端减少与正端增加的微管蛋白是等量的，导致微管聚合体呈现平衡移动（细节见 EXP 17-0001）。但是微管表层显示出踏车现象的混合形式，即正极端增加的要比负极端减少的速度快，这使它们能沿着膜“爬行”移动。

因此，微管成核现象分布在整个表层和微管，可在不同的方向上产生踏车现象。那么这种行为是如何有序地发生的呢？当两条“爬行”的微管相遇时，产生的结果取决于它们碰撞的角度。当碰撞的夹角是大于 40°的锐角时，微管会产生解聚作用。当生长中的微管以小于 40°角接触时，正在延伸的微管会调整其路径沿着一致的方向延伸。这样细胞表层微管可以高度有序地按平行束状排列（见图 17.38）。这种平行的组织结构的维持有可能依靠一些规则有序的交叉桥来维持，这些桥主要是由微管结合蛋白 MAP65 构成的，见图 17.40。踏车现象的特性、角度依赖的接触行为和交叉桥接首先解释了最初在不同方向生长的微管是如何被引导、限制在一定范围内沿着共同的方向延伸的。然而，依然还不清楚的是这些行为是如何协调的，以至于微管在大细胞中甚至一组细胞的表层中方向一致。植物生长激素似乎对此有一定作用。

尽管在伸长细胞中的微管是与长轴垂直的（横切面），它们也可以采用其他形式。有些情况下，它们与长轴成倾斜的关系，呈现出理发店标识一样的螺旋状条纹。它们也能和长轴平行排列（纵向），与新的纤维素微纤丝层在同一方向相伴。由横向向纵向平行方式排列的转变通常可以看作是细胞伸长活动的停止。图 17.41 所示的就是细胞由伸长区进入分化区的过程中发生的转变。

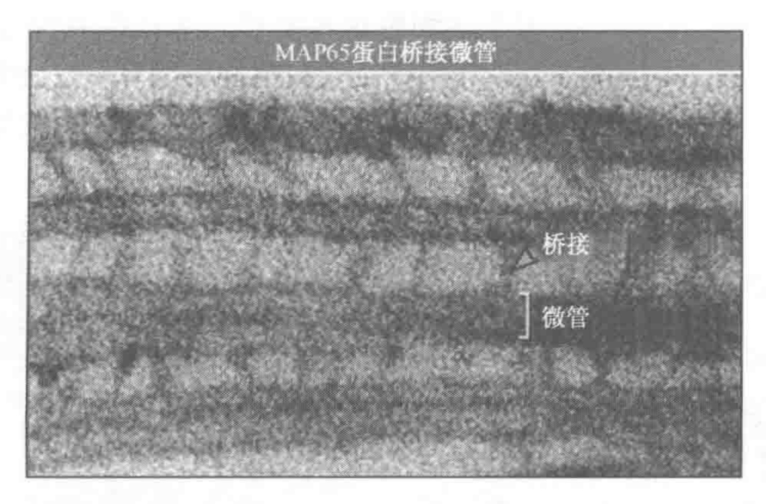


图 17.40 电镜照片显示纯微管蛋白在试管中形成的几条微管，被丝状微管结合蛋白 MAP65 交联在一起，这种蛋白沿着微管的全长，有规律地在多个空间位点连接相邻的微管。照片复制自 Chan，J.，et al. 1999 *PNAS* 96 (26)：14931-14936。Copyright 1999 美国国家科学院。

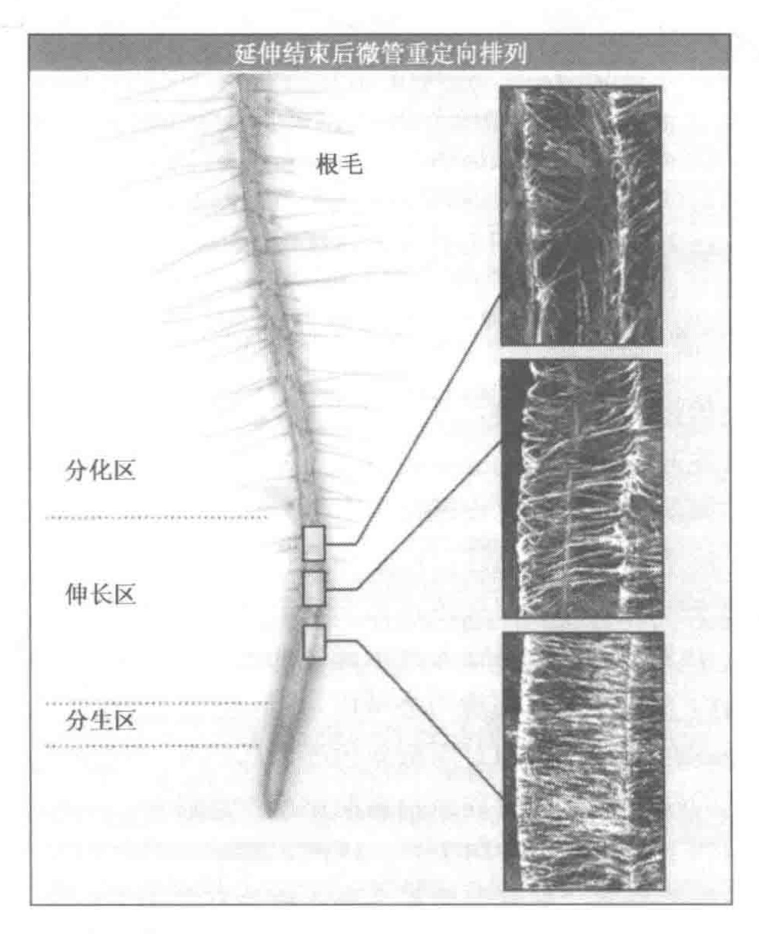


图 17.41 生长的拟南芥根部照片如左图所示。根部细胞内相似区域微管蛋白染色显示当细胞处于活跃延伸期时，微管保持与细胞长轴横向垂直排列面取向；但当细胞完全伸长时，微管沿细胞长轴纵向重排。左图由 Michigan 大学的 John Schiefeibein 博士惠赠，右图复制自 Sugimoto，K.，Williamson，R. E.，and Wasteneys，G. O. Plant Physiol. 2000. 124：1493-1506. Copyright © 2000 美国植物生物学家协会。

影响植物形态和生长的许多因素在细胞水平上都是通过控制微管方向来发挥作用的，如图17.42所示。一个例子是乙烯气体，它在植物体内有类似激素的作用。乙烯在植物体内产生并被释放到受创伤的区域，但也能在实验中以气体形式加入。施用乙烯后抑制细胞伸长，导致植物株型矮小。

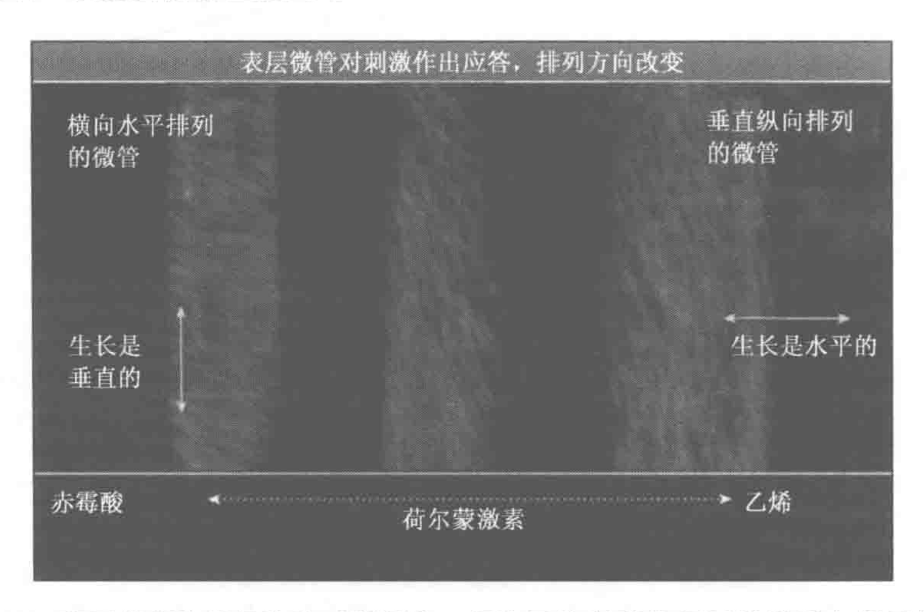


图17.42　豌豆茎部生活细胞的三张照片。细胞已注射荧光标记微管蛋白用于标记微管，图中显示为浅灰色。在大约1.5h的过程中，微管从大部分采取横向排列分布（左），经过中间的过渡（中央），大部分转变为呈纵向（右）。从纵向到横向排列转变也是可能的。植物生长激素乙烯引起从横向到纵向的转变；赤霉酸引发相反的转变。这些激素通过影响微管的定向控制细胞生长的方向。照片复制自 Yuan，M.，et al. 1994. *PNAS* 91：6050-6053. Copyright © 1994 美国国家科学院。

乙烯引起细胞内的微管重新定向，从与根-芽轴垂直的方向变为与轴平行排列。伴随微管的重排，纤维素排列方向也发生变化，以至细胞只能垂直于轴方向伸长（“侧面”），不是通常的顺着轴的方向，从而产生比正常形态更短、更粗的植株。另一种激素——赤霉酸，刺激茎的伸长，使微管方向与上述作用翻转重排，重新回到与轴垂直的方向而纤维素的沉积也发生相应的方向改变，使细胞停止侧向延展、恢复轴向伸长。其他几种激素也被人们认识到是通过改变表层微管的排布和细胞延展的方向而影响植物生长。甚至众所周知的植物生长方向影响因子——光照和重力也可能通过微管进行调节的。可以看到植物对这些影响因素的反应是，在生长轴的相对两侧采用不同的微管排列方式从而产生相应的细胞伸展不同方向。一侧的快速细胞伸长和另一侧的细胞生长抑制引起植物的弯曲生长，引导茎尖向着光照或根尖朝下沿着重力方向生长。因此，固定的植物被认为能通过控制根或茎战略转折点部位的细胞伸长来“驾驭”生长方向；微管在其中发挥着至关重要的作用。

17.16　散布的高尔基系统运输囊泡至细胞表面以利细胞生长

关键概念

- 细胞生长所需质膜和细胞壁物质由内质网/高尔基系统提供。
- 高尔基体在植物细胞内呈散在分布。
- 肌动蛋白系统推动高尔基体在粗面内质网中的动态变化。

到目前为止，我们集中研究了细胞膨大时微管和纤维素微纤丝如何使细胞壁生长。本节要考虑质膜如何随同细胞壁一起生长，以及除纤维素外的其他组分如何被运至细胞壁。

细胞增长需要产生大量的新膜。一般而言，膜不是很有弹性且伸展性也很差，因此随着细胞的生长新膜要不断地掺入，这需要胞外分泌的参与，这是通过细胞膜包裹的囊泡与质膜的融合来完成的。胞外分泌不仅将囊泡膜插入质膜中，也同时释放囊泡内含物到胞外，囊泡使内含物可以整合到正在生长的细胞壁中。这些囊泡通过内膜系统的分泌途径产生。这是一个高度动态的膜围绕间隔系统，系统内的物质通过内部连接微管或囊泡有序地从一个隔室到另一个隔室，通过出芽脱离隔室后相互融合形成。内质网是内膜系统的主要组成部分，组成一个由膜管和膜层构成的三维网络结构，从核膜延伸至质膜下。内质网结合的核糖体合成的蛋白质进入内质网，并通过内质网运输至高尔基体，在那里蛋白被分类后运输至质膜用于细胞生长，或运至液泡被储存或降解。

正在生长的植物细胞高尔基体负责合成许多用于构建新细胞壁的物质。除了与动物细胞的高尔基体一样，进行蛋白质糖基化和分选来自于内质网的蛋白，植物细胞的高尔基体还合成除纤维素和胼胝质外所有大分子复杂的细胞壁多糖。细胞壁的碳水化合物组分在高尔基体内合成和预组装，包裹在囊泡中输出。尽管动物细胞外基质含有带糖侧链的蛋白质，但植物细胞生长和分化期间所需要的大量新细胞壁组分意味着比起除少许特化细胞外的所有动物细胞，植物高尔基体承担更重的糖类合成任务。

尽管高尔基体事实上不合成纤维素，但它有时在其定位方面发挥作用。含有纤维素合成酶的六角形复合体在高尔基体内装配，在高尔基囊泡内被运抵质膜。

这些囊泡的定位运输是植物细胞用于加厚特定区域而不是其他部位细胞壁的方法之一。除了运送囊泡到质膜，高尔基体还发送囊泡到液泡以使其膨大。这些囊泡的膜供应给液泡膜，同时其内含物能够协助液泡内部功能的特殊化而不是简单地填充空间。例如，种子细胞的液泡用于储存大量的特定蛋白质，在以后种子萌发为植物体的初始阶段，这些蛋白将会被水解为植物的发育提供氨基酸。储存蛋白及其水解酶都是由高尔基体产生的囊泡运输至液泡的。

植物和动物细胞内质网和高尔基体的总体分布是不同的。动物细胞的内质网从细胞核延伸至细胞质内的整个三维空间；高尔基体通常是一个位于细胞中央靠近细胞核位置的单一的连续单元。植物细胞的内质网也与细胞核相连，但是细胞其他位置的该系统基本上是一个二维系统，因为大而臃肿的中央液泡将细胞质挤压、拉平为质膜下的一薄层。图 17.43（见图版）显示液泡化的植物细胞内质网的二维自然状态，图 17.44 显示了内质网和质膜间在细胞中是如何紧密排列的。植物细胞的高尔基体也靠近质膜。不像动物细胞，植物细胞内的高尔基体并不聚集在细胞核周围，而代之以多层潴泡的形式分散在整个细胞质表层。图 17.45 显示植物细胞质中几个独立的高尔基堆。内质网和高尔基体两者贴近质膜的分布使得植物细胞具有多元的细胞壁组分的合成位点，同时将合成物分泌至液泡化植物细胞扩展中的细胞壁广大区域。

植物细胞的内质网和高尔基体的分布依赖于微丝骨架，与此完全相反，动物细胞这两种细胞器是通过微管分配的，而在植物细胞中是由于与微丝纤维的联系。图 17.46（见图版）显示植物细胞内几乎所有的高尔基体如何专一地与微丝束相连。当细胞生长

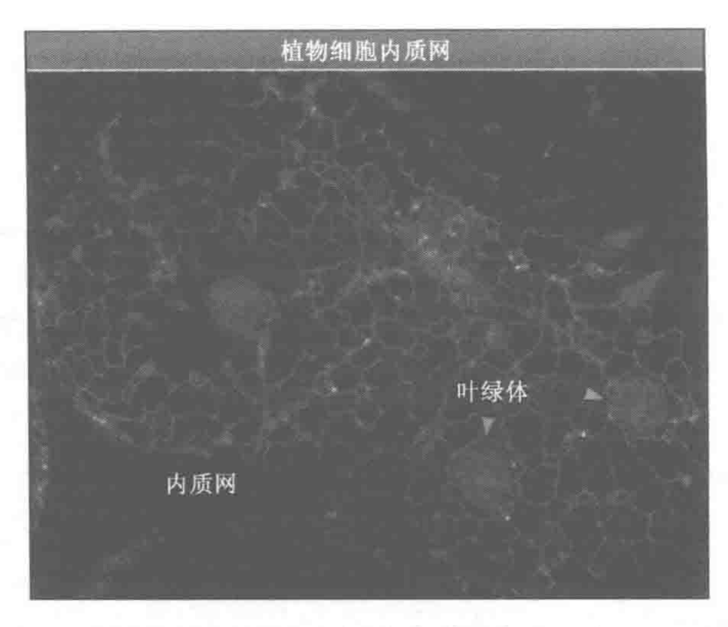


图 17.43　一个活的表皮细胞只局限在内质网表达一种 GFP。焦点平面在细胞表面下，可以看到遍及细胞整个表层的内质网二维伸展网络结构。几个叶绿体靠近表层并被内质网围绕。叶绿体不含 GFP；它们之所以呈绿色，是因为在激发 GFP 的光波下，叶绿体自身荧光被激发。照片复制自 Boevink，P.，et al. Plant J. 1996. 10（5）：935-941。Copyright© 1996 Blackwell Publishing.

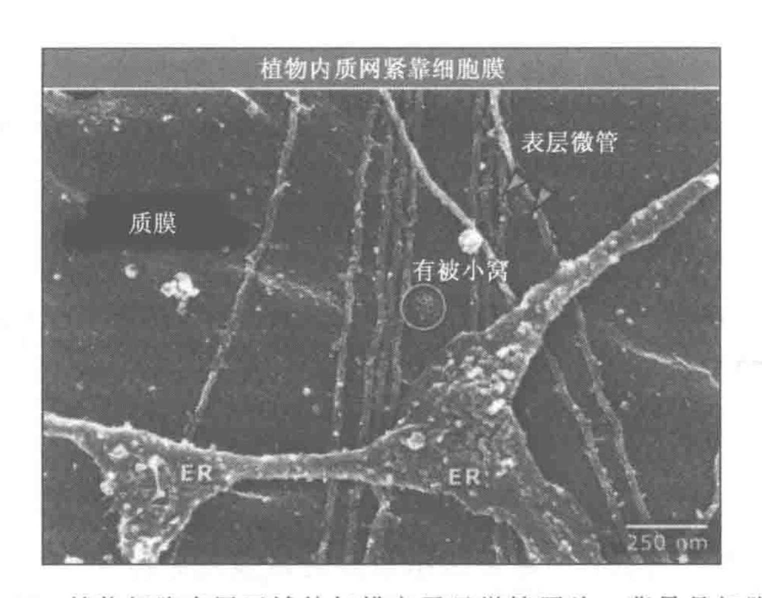


图 17.44　植物细胞表层区域的扫描电子显微镜照片。背景是细胞质膜内侧表面。可见几个内质网小管和它们的两个分支点。照片由 UMASS-Amherst 的 Tobias Baskin 惠赠。

时，通过微丝依赖性运动使内质网和高尔基体扩展至细胞的新区域。无论如何，这样的运动不仅仅局限于渐进式形式。植物细胞的高尔基堆是高度运动性的，能在几乎不动的内质网表面保持持续移动。这种移动能增加内质网的面积，使高尔基堆易于接受货物，提高两个细胞器间的物质转移速率。

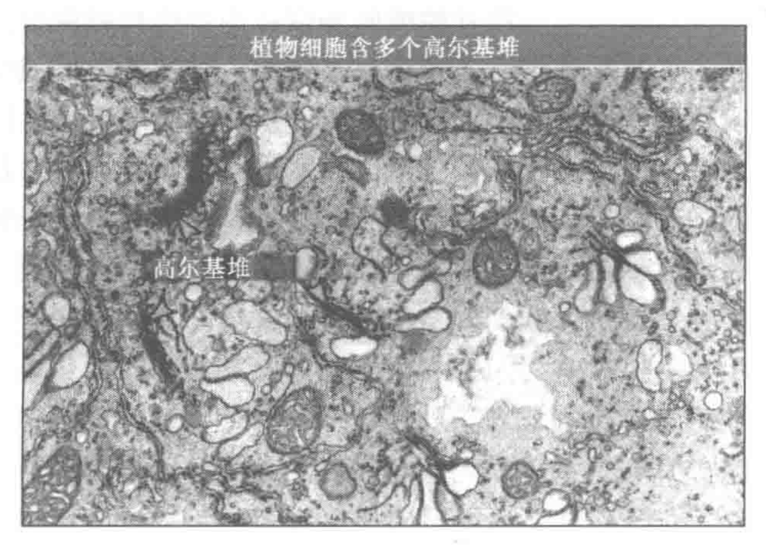


图 17.45 玉米根冠细胞部分原生质的电子显微镜照片，显示多个独立的高尔基堆。许多相似的高尔基堆遍布于原生质的其他部分，许多细胞含有 30 个甚至更多。沿着照片左边和右上侧可见又长又薄的内质网。大约六个线粒体呈圆形或椭圆形，内部膜层高度折叠。照片由 Oxford Brookes 大学的 Chris Hawes 惠赠。

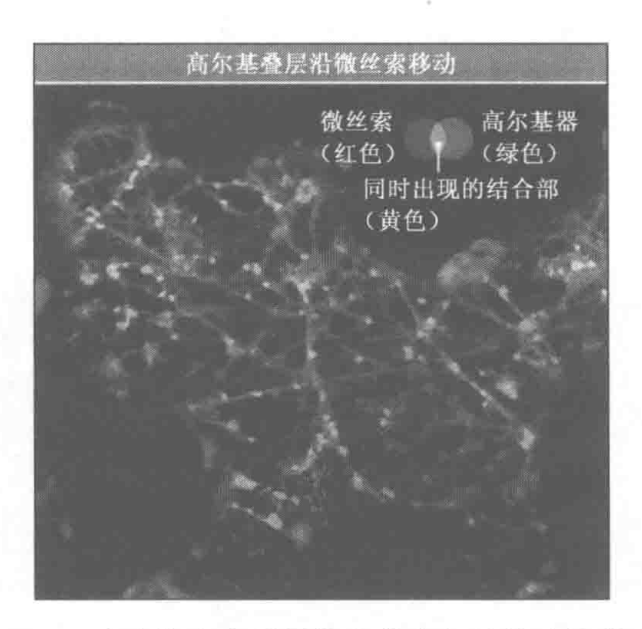


图 17.46 一个叶片表皮活细胞在其高尔基体表达荧光蛋白（绿色），同时标记了微丝蛋白（红色）。黄色表示两者同时存在，一个长微丝索的伸展网络在胞内可见。可见圆点状的高尔基体，几乎所有的高尔基体分布有微丝索。照片由 Oxford Brookes 大学的 Chris Hawes 惠赠。

17.17 微丝纤维形成网络担负细胞的物质运输

关键概念

- 肌动蛋白和肌球蛋白互作供能的细胞质流动使细胞器和囊泡在细胞内运动。
- 植物有两种独特的肌球蛋白。

随着液泡形成的细胞生长，细胞开始面临如何在内部进行物质分配的问题。而随着细胞生长，细胞质在不断扩展的细胞表面会变得很薄，植物细胞才能变得非常大。细胞的巨大内部空间和表面积都需要积极的方法来保证：一是无论何处都需要细胞壁组分能及时地运送并整合，二是合理分配整个细胞的物质需求。植物细胞通过胞质流动解决了这些问题，胞质流动是由微丝纤维持续推动物质在细胞内的运动的特殊机制而实现的。

植物细胞中的肌动蛋白纤维形成多种不同的网络结构，并且发现与所有微管排列相关，他们似乎是连接在一起的。我们知道肌动蛋白纤维与成膜体微管呈平行排列，也同样发现在早前期带的微管中。与此相似，在细胞伸长期，纤细的肌动蛋白纤维沿着表层微管分布。因为这些纤维的排列方向是与细胞伸长方向相垂直，而伸长后的细胞有几百微米长，所以沿着这些纤维运输物质到伸长细胞的末端可能不是一种有效的方式。这种长距离运输的角色是由更粗的肌动蛋白纤维束来实现的，这些纤维束常在细胞质内且通常与微管没有联系。这些纤维束从细胞核呈放射状延伸至细胞边缘，经常是一直到达伸长了的细胞末端；而且对穿过液泡延伸的细胞质薄层起着支持作用。在图 17.47 显示的细胞中，可见到几条这样粗大的肌动蛋白纤维束。大的主要的微丝束与细胞伸长方向平行一致，并常常分布到伸长细胞的末端。用一台简单的光学显微镜就能很容易看到许多细胞质内含物沿着这些细胞质链进行快速的双向移动。这些细胞质内含物颗粒围绕细胞的稳定流动就构成了胞质的环流。像叶绿体、内质网、高尔基体和细胞核这些细胞器，以及囊泡都通过这种方式在细胞内移动。植物细胞器沿肌动蛋白运动的方式不同，动物细胞在相对较长距离的细胞器运动通常是沿着微管进行的。总之，两种类型细胞微丝骨架的组成和使用方式是不同的。不像动物细胞那样，肌动蛋白微丝通过形成片状伪足和丝状伪足结构来驱动细胞运动，植物细胞的肌动蛋白微丝直接用于细胞内运动。

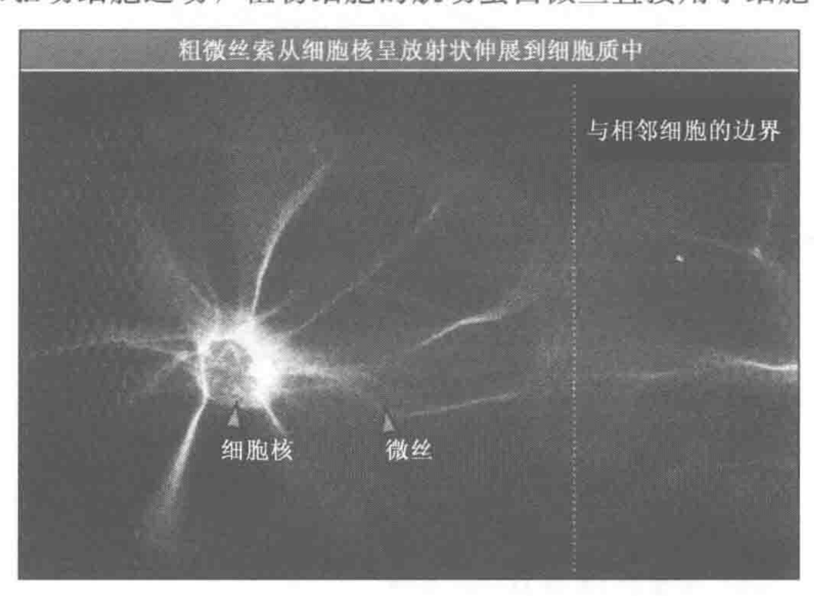


图 17.47　一个含液泡细胞的荧光显微照片，荧光标记肌动蛋白显示大微丝索从细胞核附近延伸至细胞外围。这些微丝索分布在穿过液泡的原生质丝中，并将细胞核与靠近质膜的原生质薄层连接起来。照片由 Clive Lloyd 惠赠。

肌动蛋白微丝依赖性运动是通过肌球蛋白家族成员提供动力的。以细胞器运动为例，有关的肌球蛋白位于细胞器表面驱使细胞器沿着微丝纤维束“走动”。植物细胞含有多种动物细胞不存在的肌球蛋白，而缺少至少一种动物细胞内很丰富的肌球蛋白，或

许这反映出植物细胞微丝骨架的不同用途。例如一种“非传统的”肌球蛋白（意思是它不形成微丝），肌球蛋白Ⅷ就只存在于植物并聚集在新形成的细胞壁，特别是胞间连丝内尤其丰富。微丝纤维与细胞的连接，即胞间连丝的关系解释了微丝束是如何从细胞一端伸展至另一端的。无论如何，植物似乎没有能形成纤维丝的肌球蛋白Ⅱ，在肌肉细胞中该蛋白能够同时拉动两条肌动蛋白微丝纤维引起收缩。动物细胞通常利用肌球蛋白Ⅱ进行运动或改变形状，所以植物细胞缺少这种肌球蛋白或许是其固定的生命活动方式的一种反映。

不仅颗粒物质在微丝纤维轨道上移动，而且微丝纤维自身也是高度动态的。植物细胞中许多微丝结构中的微丝纤维处于不断的解聚和重新聚合中，这样使得整个结构在需要时能改变形状。这些肌动蛋白微丝结构的动态性可能是由多种与动物细胞内影响肌动蛋白动态性的相同的蛋白引起的。尽管动物和植物细胞肌纤凝蛋白系统组成方式不同，但是它们还是有许多相同的肌动蛋白微丝结合蛋白。

进化上保守的分子，例如肌动蛋白抑制蛋白和微丝解聚因子（ADF），存在于植物细胞并被证明影响纤维的聚合和解聚的动力学。绒毛蛋白，小肠微绒毛内的一种主要蛋白，也存在于植物中，负责将微丝纤维组装成具有相同极性的微丝纤维束。这样，绒毛蛋白间接地决定和引导颗粒物质在这些高度动态的纤维索上的移动方向，因为一种肌球蛋白——马达蛋白只能沿微丝纤维的一个方向移动。这些保守的肌动蛋白的作用强调了这样一个事实，就是尽管植物细胞是非移动的，但它们的内容物充满生命活力而绝对不是静态的。

17.18 木质部细胞的分化形成需广泛的特化

关键概念

- 木质部的程序化死亡细胞排列形成输水导管。
- 次生壁横向加厚可防止导管从内部破裂。
- 表层微管捆轧成束的模式决定次生壁增厚模式。

到目前为止，我们阐述了分生组织中的细胞分裂和伸长期间的细胞壁和细胞质的组成。无论怎样，当细胞停止伸长时就开始分化形成特化组织的过程。分化涉及细胞壁基于一般意义和特殊目的的修饰。尽管分裂区和伸长区的未成熟细胞的壁强度非常高能经受膨压，但是它们还没有坚固厚实到足以扮演它们在成熟植物部分中必须扮演的角色。随着细胞的分化，细胞壁通过增加新的、经化学修饰的薄层而得以加厚，这就是次级加厚。这些加厚的细胞壁提供足够的强度支撑分生组织，防止植物生长时因自身重量增加而被压倒。除了一株植物所有细胞在分化时壁的正常加厚外，当一些细胞分化成高度特化的组织时还利用其他方式修饰其细胞壁。一个植物细胞分化形成特化组织过程的例子就是木质部的形成，即根部和顶芽部成列的伸长后细胞分化形成脉管组织——木质部和韧皮部。木质部内的细胞首尾相连形成管道，用于从根系统输导水分到整个植物体直至地上的顶端生长点。水和溶解的矿物质由根毛的广大表面区域吸收，运达根部中央，并通过连接根部细胞的胞间连丝进入木质部。地面以上，阳光照射的热量促使水分蒸发，使水分通过叶片的气孔散失到空气中。通过蒸发散失水分，或者称“蒸腾作用”产生的抽吸力，将水向上“拉”到木质部。这种蒸腾作用驱动水分上行流动到整个植物体的机

制对于维持细胞膨压和防止植株萎蔫是很重要的。

为了形成这些连续的管道（这些管道在大树中可达几十米长），单个木质部细胞在分化过程中经历了几个有趣的特征时期。这个过程可以通过图 17.48 加以阐明，它启始于伸长区的生活细胞。这些完成伸长、不再膨大的细胞经过细胞壁的次级加厚。胜过各处细胞壁平均增厚的方式，依据物种不同这些细胞壁的加厚呈现出多种形式（包括环箍状、阶梯状、网状、螺旋状等）。而这些细胞壁加厚形式的共同特征是：本质上都是横向的带或者说如肋骨般包裹细胞，加强成熟木质部的细胞壁，然后经过化学修饰使其具备防水能力。上述特化过程完成后，这些细胞经过细胞程序性死亡过程，并将它们相互连接的末端细胞壁降解后，留下一个上下贯通植株体的连续中空管。图 17.49 显示了几个可见的成熟木质部组成元件，因为这些管道细胞壁的加厚形式常是环箍式或肋骨式的，使它们看起来很像气管——人类呼吸系统的空气管道——并被命名为导管。加固的细胞壁防止了蒸腾作用产生的吸力和邻近细胞对中空管道产生的挤压力量而导致导管从内部崩塌。

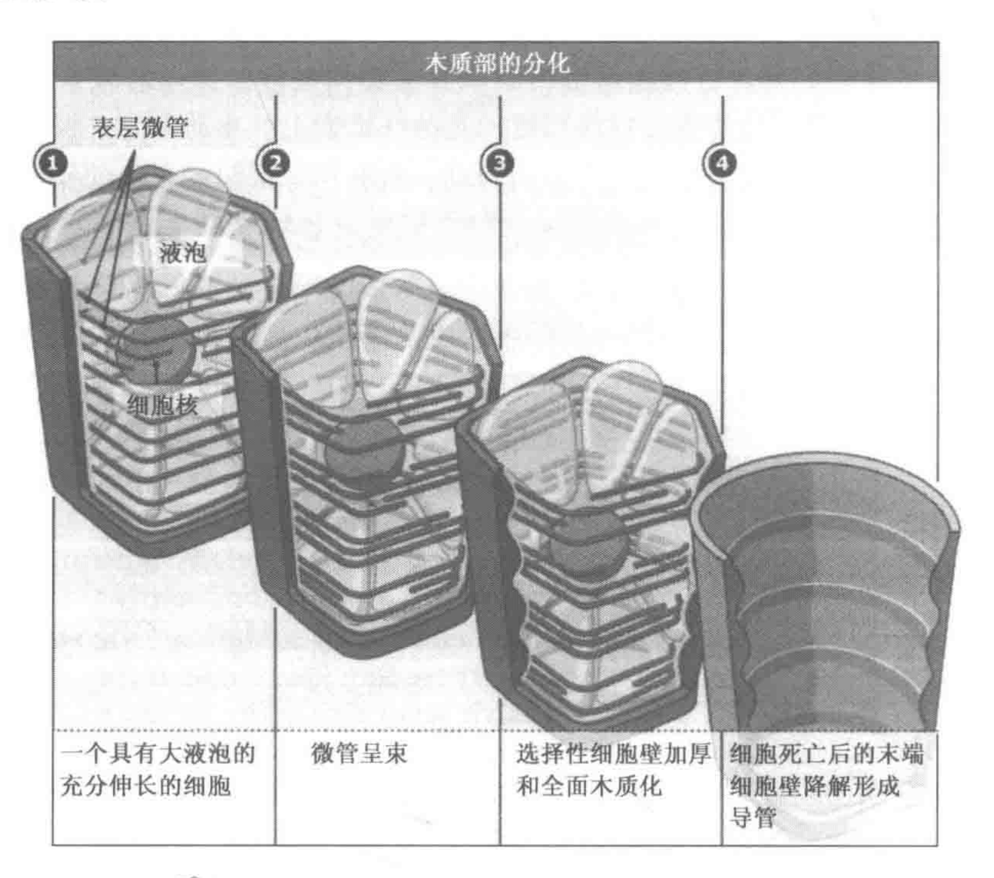


图 17.48 细胞分化形成木质部导管的连续过程。

观赏性植物鱼尾菊的实验发现了一些与导管形成有关的细胞变化过程。令人好奇的是，通过轻轻研磨叶片而释放的叶肉悬浮细胞，能在培养基上生长、并被诱导转分化成专一的导管组分，这种人工体外培养体系证实了在植物体内实际发生的一些过程。如图 17.50（见图版）所示，最初是表层微管束连在一起，形成几个明显的横向带；然后纤维素微纤丝在这些维管束上铺设，形成以纤维素为主要成分的、结实的次级加厚细胞壁骨架。微管的组织形式与细胞壁加厚的形式密切一致，而当微管的分布被微管解聚药物改变后，非正常的细胞壁结构也随之产生。在微管中也发现微丝纤维，这表明两种纤维

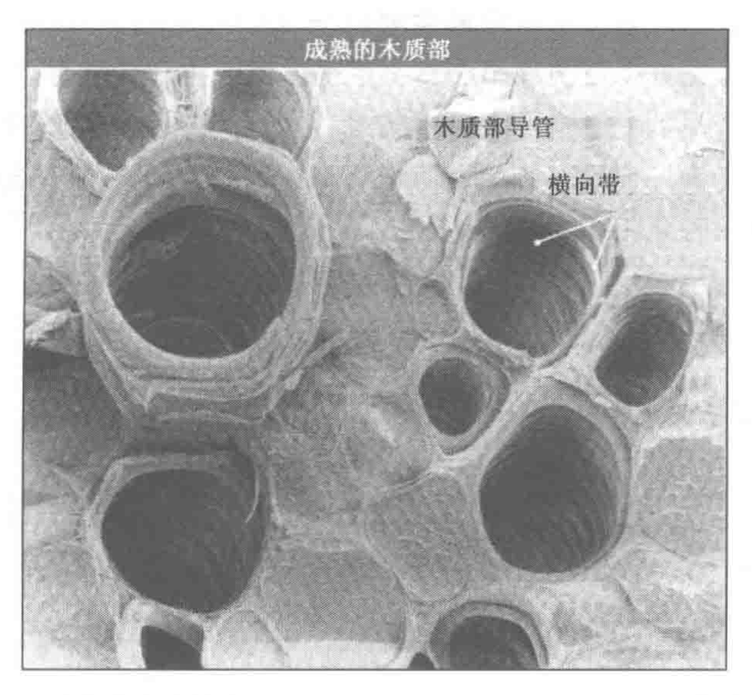


图 17.49 鱼尾菊叶片的扫描电镜照片显示数个木质部导管。导管的断面可见其细胞壁内侧的环状物加厚。照片由 John Innes 中心的 Kim Findlay 惠赠。

系统在次级细胞壁形成中是相互作用的。细胞骨架组分影响细胞壁构成模式的一种可能机制是将胞外囊泡集中运输至需要加厚的细胞壁位点。这些囊泡含有要插入质膜的纤维素合成酶复合体，而囊泡的定向运输能够限定纤维素沉积的位点。囊泡还含有其他的多聚糖和次级细胞壁的结构性蛋白等分泌性产物。一旦加厚完成，整个细胞壁被一种称为

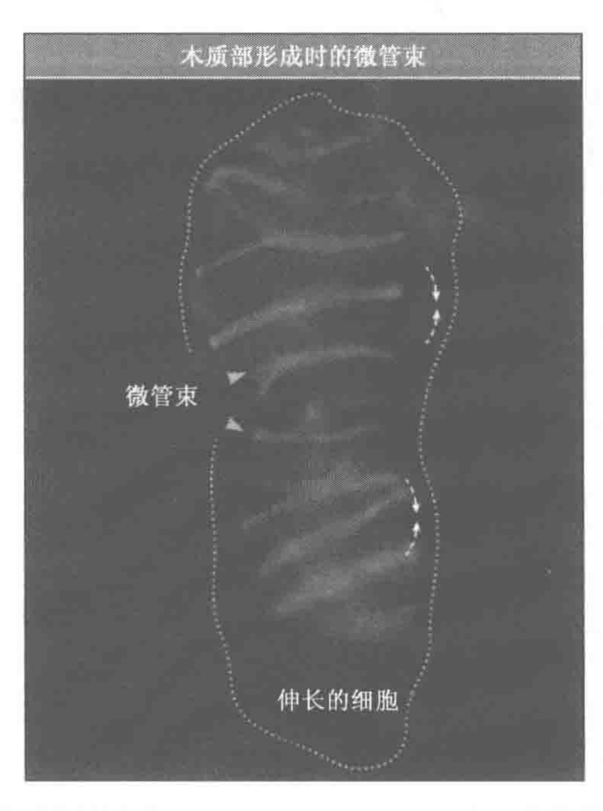


图 17.50 一个分离的鱼尾菊细胞向木质部细胞分化过程中的微管分布。微管通过微管蛋白免疫荧光标记显示，细胞的轮廓由点线标示。细胞处于分化的相对早期。微管在大部分细胞表层中的相对均匀分布变为环绕细胞长轴的粗大微管束。照片由 Guojie Mao 惠赠

木质素的物质修饰。木质素是木材中的主要组分（20%～35%），是三种芳香醇（单木质素）通过氧化聚合化产生的疏水聚合体。因为其疏水性，它在导管内表面行使防水作用。木质化的另一个目的是强化细胞壁，帮助它们支持其上面部分因生长而增加的重量。细胞壁的这些修饰完成后，细胞就溶解死亡，其细胞两端的壁被降解，留下的加厚中空管道就是成熟的特化组织。

17.19 顶端生长需要植物细胞的延伸

关键概念

- 细胞壁物质的高度区域划分泌使植物细胞能延伸很久。
- 顶端生长的细胞，微丝纤维和微管基本平行于向外生长的方向。
- 微丝纤维束引导囊泡向顶端运输，与那里的细胞质膜融合并驱动细胞膨大。
- 微管似乎控制着细胞顶端的数量和位置。
- 共生细菌转为顶端生长，而靠自身进入植物体。

我们前面的论述主要专注于细胞壁组分的合成，以及如何均一地加入到细胞壁的伸展一侧的细胞新陈代谢机制。这种扩散生长方式是植物细胞通过膨胀确定自身形态的主要机制，但并不是唯一的方式。一些特化的细胞将膨胀限制在一个很小区域，使延伸的路径很狭窄，仅仅在其顶端生长。这样的顶端生长的机制与支持一般细胞伸长的机制有很大不同。

这种顶端生长方式因细胞壁前体物质的高度定位运输而成为可能，字如其意，在伸长过程中，细胞壁前体和膜物质只掺入到其圆顶形的尖端，如图 17.51 所示。结果从细胞侧面出现管状延伸物，其长度能达到细胞自身的许多倍。这种类型的生长可形成根毛和花

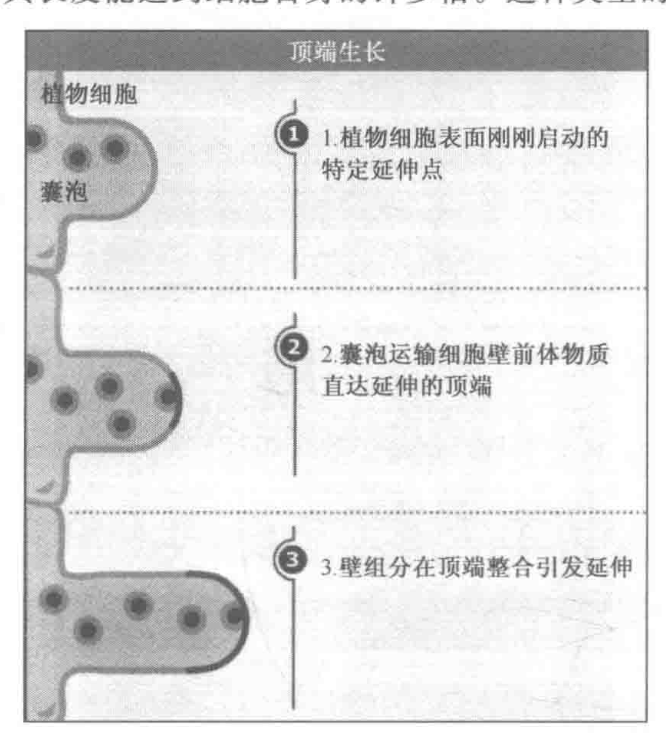


图 17.51 因为高度局限性运输以及含细胞壁前体的分泌囊泡的融合活动，顶端生长是可能的。在路径顶端囊泡与质膜的持续融合活动驱动路径的延伸，从细胞侧面产生一个直径恒定的长延伸体。

粉管。如图 17.52 所示，根毛在分化区的一个特化表皮细胞（称为生毛细胞）顶点末端以凸出物的方式发育形成。纤细的白色根毛从根两侧以与根生长垂直的方向生出，大大地增加了根部吸收水分和无机离子的表面区域。

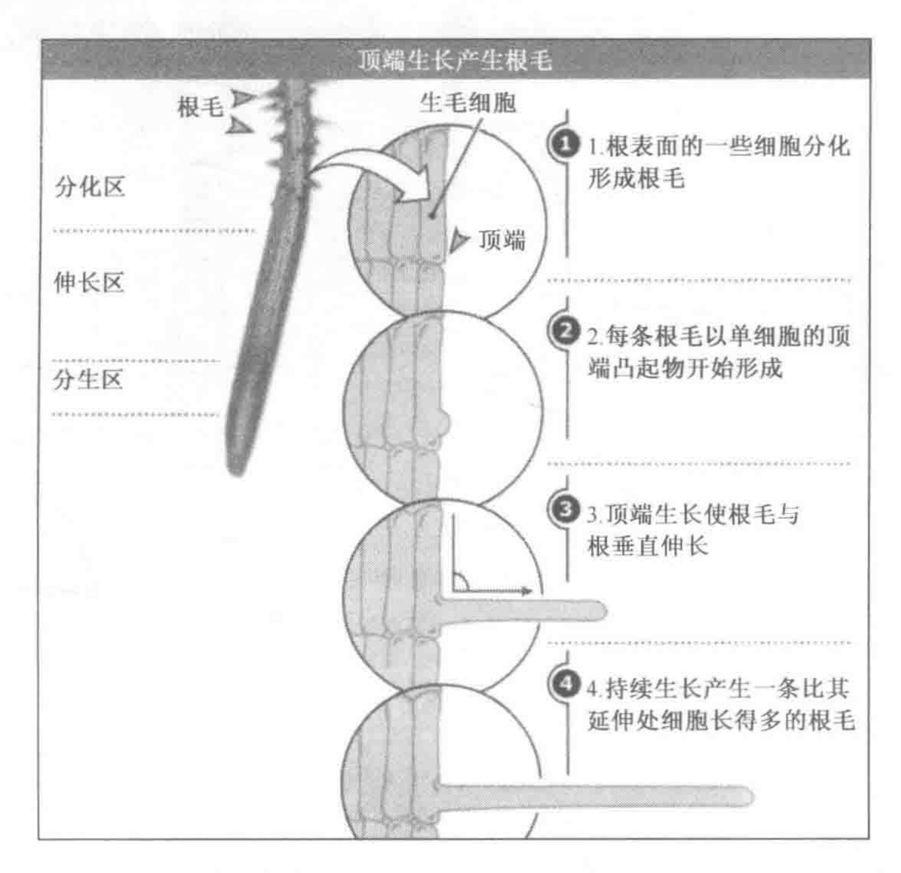


图 17.52　左边是一条拟南芥的根。作为根部分化的结果，根毛形成并超出其表面。图序列显示了单个根毛的生发过程，每个根毛都是单个细胞的延伸。照片由 Michigan 大学的 John Schiefelbein 惠赠。

花粉管的形成赋予植物在严酷环境下一种自主运动能力。植物有性繁殖期间要进行授粉，授粉就是来自于成熟雄花的一粒花粉，由昆虫或风力带到雌花并粘在用以捕捉花粉粒的天线状结构——柱头上。柱头通常很大以增加捕捉到花粉粒的机会，但是柱头与花的胚珠还是有一定距离的，胚珠内含有未受精卵。花粉粒的顶端生长能穿越这段距离到达胚珠。如图 17.53 所示，花粉粒顶端生长形成的花粉管沿柱头向下到达胚珠，花粉管传递的精子与卵融合产生二倍体胚。图 17.54 显示的是一个已经萌发出花粉管的花粉粒。

经历顶端生长的细胞的内部是高度极化的。当细胞体和大部分的区域被液泡占据时，生长的顶端及紧随其后的区域充满着细胞质。与植物主要部分的伸长细胞不同，微丝纤维和微管也出现在顶端生长区域内，并且与其生长方向是平行的。微丝纤维与顶端生长方向平行的例子如图 17.55 所示。在这种情况下，包括微丝和微管的所有纤维都按照相同的极性排列，其快速生长端（正极）更靠近生长的顶点。这种结构方式能使细胞骨架起到运输分泌囊泡到顶端生长点的作用。囊泡表面的肌球蛋白分子驱动胞质流动，运输囊泡至紧贴顶端生长点后的区域，也就是微丝纤维的终点。囊泡运输沿着生长管的细胞壁进行，一旦到达顶端囊泡就被释放并流入生长点中央，这一过程被称为反式泉

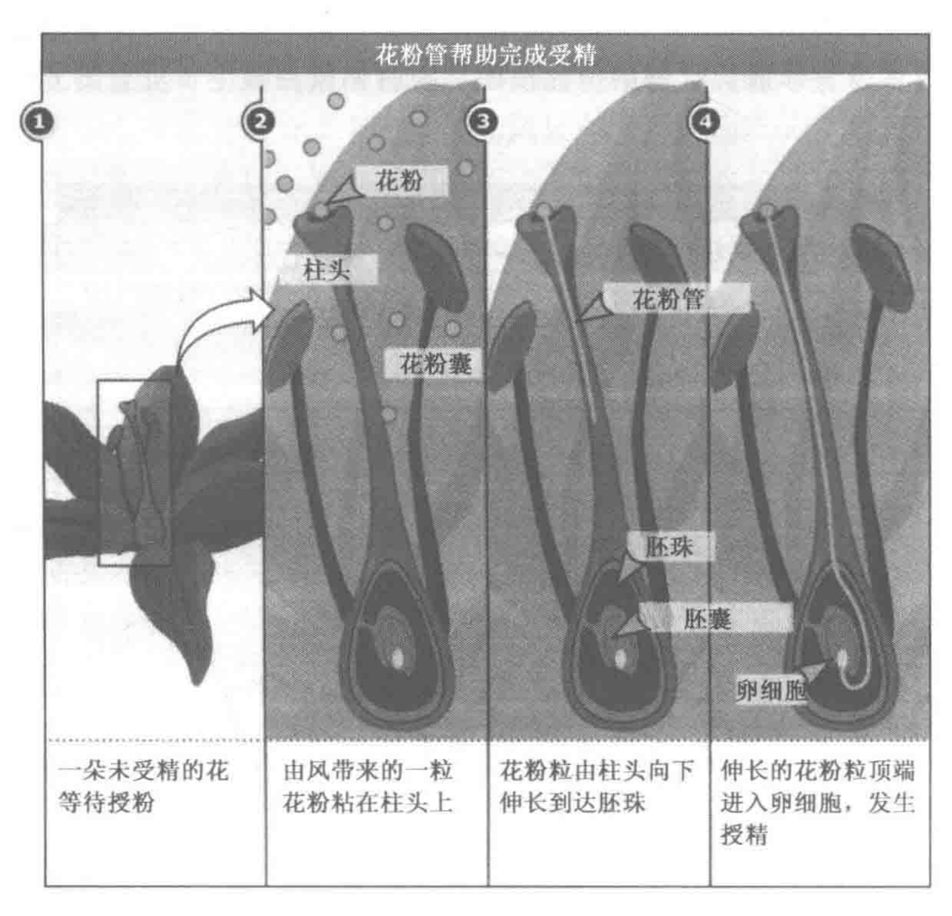


图 17.53　顶端生长赋予某些植物细胞的运动性。受精期间，被雌花捕捉到的花粉粒利用顶端生长伸长一段距离到达卵细胞。伸长距离是花粉粒大小的数倍。

流，如图 17.56 所示，如此高浓度的囊泡在顶端积累以至于几乎所有的其他细胞器都被排除在外。囊泡与顶端质膜融合使得管子生长。由于在囊泡运输方面起中心作用，微丝纤维必须在生长管的顶端持续增长，以保证管子继续伸长。有人认为花粉管中，源自生长顶端的钙离子浓度梯度调节着几种微丝结合蛋白，以确保微丝聚合所需的游离纤维末端。

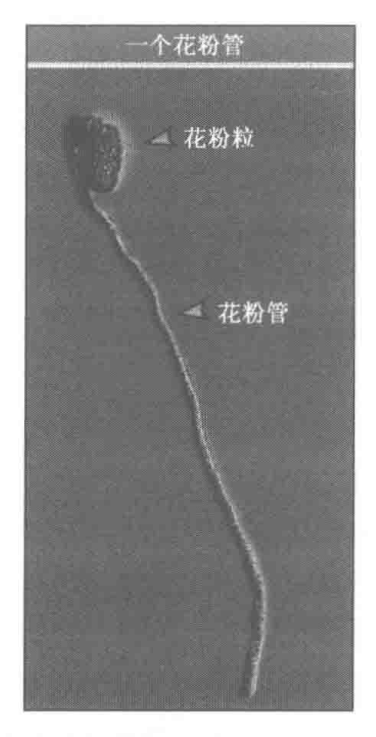


图 17.54　诱导萌发了花粉管的花粉粒。位于图左上方是的原初的花粉粒。萌发的花粉管长度可达花粉粒自身大小的很多倍。照片由 Nurbert De Kuijter 惠赠

微管在顶端生长中的作用不如微丝研究得清楚。用药物解聚正在生长中的根毛的微管，根毛能继续生长，但生长成为锯齿状形态，个别时候形成多个

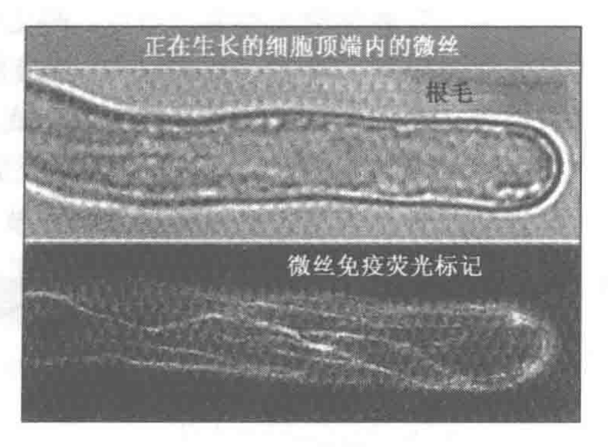


图 17.55　上图显示一个充分伸长的根毛的顶端环绕着中心液泡的细胞质薄层，在最顶端的外围细胞质中仍进行着胞质环流。下图显示荧光标记的纤维肌动蛋白的图像，值得注意的是肌动蛋白微丝纵向分布在根毛的全长。照片由 Norbert de Ruijter 博士惠赠。

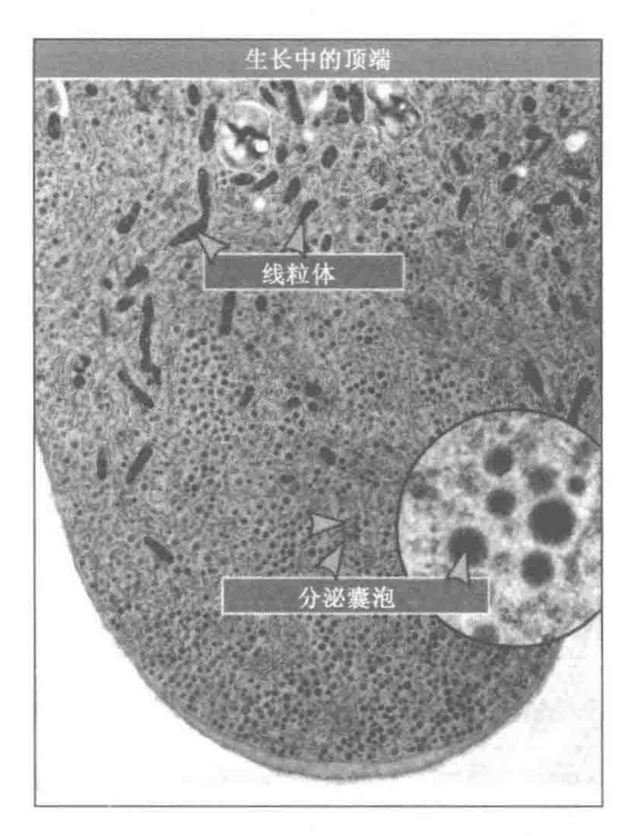


图 17.56　生长中的根毛顶端内部的电子显微镜照片。微丝骨架运输的分泌囊泡高度集中于顶端，排除了大部分其他细胞器，例如线粒体。囊泡与质膜持续融合驱动顶端伸长。照片复制自 Lancelle，S. A. and Hepler，P. K. Ultrastructure of freeze-substitute pollen tubes of Lilium longiflorum. 1992. *Protoplasma* 167：215-230。

顶端。因为无论管体以任何形式生长，都说明囊泡被运至顶端，因此这些结果显示微管以某种方式进行着顶端生长的整体空间调节，而在囊泡运输和融合机制中不发挥作用。

共生固氮菌正是利用根毛的顶端生长而侵入豆类植物根部的。如图 17.57 所示，细菌贴附到根毛顶端生长点附近，引起根毛包围细菌卷曲成如牧羊人手杖样的弯钩状。一

旦细菌以这种方式捕获根毛顶端，就能够侵入根毛。而后，根毛的顶端生长被抑制，并自我回转（就像橡皮手套内弯曲的手指）形成“感染线”，细菌沿此线回溯到根毛内部并渗透到细胞内。为促成这种生长的反转，细菌必须以某种方式控制涉及囊泡的运输及其在顶端融合等过程。细菌通过感染线到达植物细胞主体后首先引发一系列的细胞分裂，最后形成一个细菌菌群聚居生长并向植物提供还原态氮的节结。

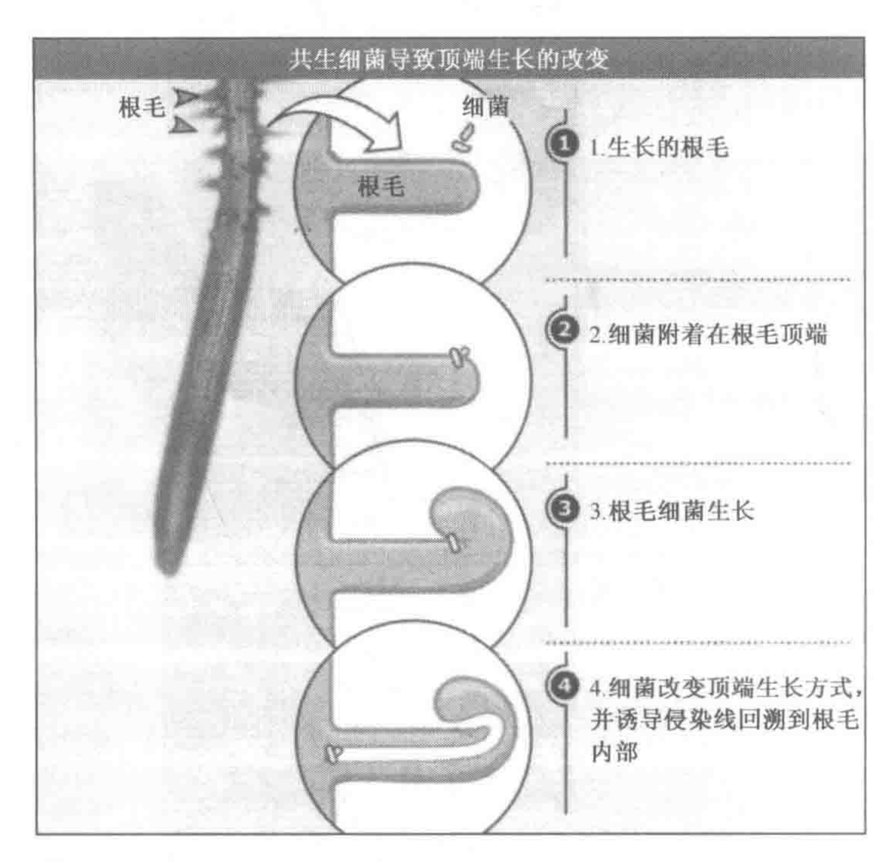


图 17.57 图中显示了共生细菌如何通过改变根毛的生长方式而侵入根的内部。照片由 Michigan 大学的 John Schiefelbein 惠赠。

17.20 植物细胞具有称作质体的特有细胞器

关键概念

- 质体是植物所特有的膜结构细胞器。
- 质体存在多种类型，每种具有不同的功能。
- 所有的质体来自于前质体的分化。
- 在进化过程中，质体由内共生起源。

质体是植物特有的膜结构细胞器。质体有许多不同的种类，主要依据它们所处的组织不同而加以区分。简而言之，质体行使着特殊的功能，在动物细胞内没有类似的细胞器。

如果不考虑它们的功能，所有的质体都具有很多共性。质体都是由两层膜围成的细胞器，这两层膜紧密并列着围绕整个细胞器表面。在质体内部（称为基质）是自由漂动的膜基粒，它们由两层界膜中内膜上一些位点的内陷和修剪形成。质体与大多数其他细胞器不同的是拥有自身的基因组，每个质体都有多拷贝的一个小的环形可编码大约 100 个基因的环形的基因组。基因组编码质体高度特化功能所需的蛋白（例如光合作用所需

的膜蛋白)，以及其他转录和翻译所需要的蛋白和 RNA（例如某些核糖体蛋白、RNA 聚合酶及 tRNA 和 rRNA)。质体基因组的基因在质体内进行转录和翻译，但质体内的大多数蛋白还是由细胞核编码的。而这些蛋白要在细胞质中合成后被运入细胞器，并且准确地定位在多种膜包围的不同组分中。像线粒体一样，质体并不通过囊泡运输与任何具有分泌途径的细胞器相联系。

所有类型的质体都是从一共同的被称为前质体的细胞器分化而来，前质体通常可以在活跃分裂的细胞内发现。前质体是小的、圆形细胞器，仅有未发育的内膜，没有任何特化形式；它们的主要功能似乎就是在需要的时候分化产生质体。细胞离开分生组织开始形成一种特定组织后，前质体开始分化并获得特殊的功能。质体分化发育形成的类型依赖于细胞的类型。在有光存在的条件下，在植物叶片和其他绿色部分前质体发育成叶绿体，用来收集光能和进行光合作用。图 17.58 显示的是叶片中行使光合作用细胞内的叶绿体。另一种类型的质体被称为淀粉体，在非光合作用组织中分化形成，主要作用是合成和储存淀粉。这类质体存在于种子和块茎（例如马铃薯）中，能在基质中以自由颗粒形式储存淀粉。在根部特化的细胞内，淀粉体作为重力感应装置在细胞内沉积，起着启动根部转向或使根部向下生长的作用。

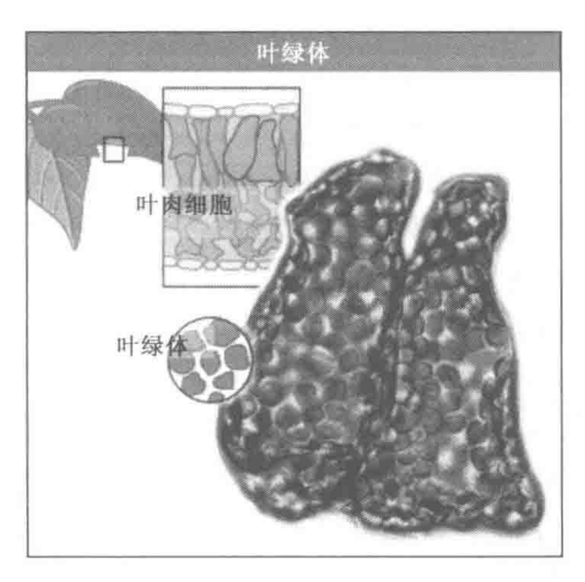


图 17.58　图示两个从番茄叶片分离的光合细胞。遍及细胞的圆盘是叶绿体。照片左上方显示的是叶片横切面示意图，用于说明这两个细胞所处的位置。照片由 Nottingham 大学的 Kevin A. Pyke 惠赠。

其他类型的质体主要负责合成植物因不同目的的需要的小分子化学物质。有色体，正如其名，主要积累红色、橘黄色或黄色（类胡萝卜素）等色素分子，赋予许多花和果实的颜色。图 17.59 显示了番茄中的有色体。另一种类型的质体称作白色体，通常是合成带有挥发性的小分子质量的有机化合物而不是色素。这类化合物经常被用作药品或香料，其中一些赋予了某些特殊植物特有的气味或味道。例如，产生薄荷油气味的分子就是在白色体内合成的。因此，合成和分泌这类化合物的细胞特化并聚集在特定位置形成腺体以帮助化合物的释放，就像橙子皮的腺体那样。

尽管质体是高度特化的，它们还是有一些共性的反应。植物在质体内进行的许多基础代谢反应活动的原因尚不清楚。植物的脂肪酸、很多氨基酸以及嘌呤和嘧啶的合成都

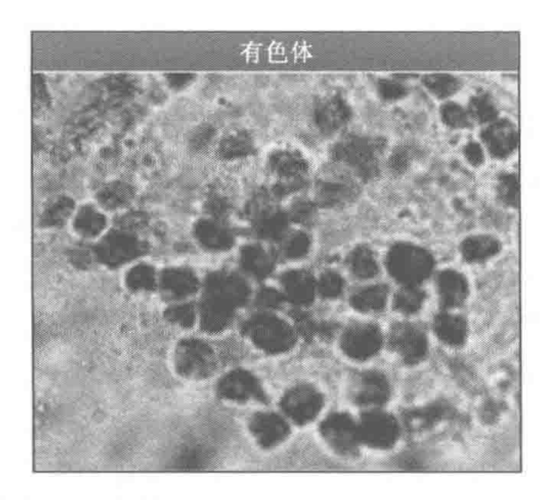


图 17.59　成熟番茄果皮的单细胞。点状物是细胞质内的积累了红色素有色体。有色体遍及番茄果皮，使其呈现明亮的红颜色。照片复制自 Pyke，K. A. and Howell，C. A. Plastids and stromule morphogenesis in tomato. *Ann. Bot*. 2002. 90：559-566。获得 Oxford 大学出版社许可。

是在质体内进行的，而动物细胞内的这些反应都发生在细胞质内。

质体一经特化形成，就展示出非凡的互变能力。有色体、淀粉体或者叶绿体都能依据周围环境或发育状态的不同而相互转换，例如未成熟番茄（绿色）的叶绿体随着果实的成熟而转变成有色体，逐渐使成熟番茄成为红色。

质体被认为是在进化的早期通过内共生起源的，其主要过程是一个光合的原核生物被一个原始的真核细胞所吞噬，内化的原核生物利用它的光合作用能力进行化学反应向宿主细胞提供能源；作为回报，原核生物可以利用宿主细胞质中的营养物质。当这种共生关系确立后，细菌/细胞器基因组的基因逐渐迁出，最终形成现在的情形，即质体的大部分蛋白由细胞核基因编码。

在分子水平进行研究检验，质体起源于细菌的学说非常清楚。质体含有自己的转录和翻译组成体系，并且该体系所涉及的蛋白也明显是细菌起源的。例如，质体的核糖体与大肠杆菌的核糖体非常相似，RNA 多聚酶也与细菌的相似。这种相似性可以扩展到整个基因组，甚至于控制质体基因表达的元件，例如启动几乎与细菌的完全一样。

细菌起源的痕迹也能在质体的增殖方式中发现。不像分泌类型的细胞器，质体可以分裂，且分裂方式很像细菌，每个质体通过在中间构建横穿的细胞壁而完成分裂，完成分裂的组分也与细菌分裂的组分相关。例如，与细菌同源的植物 FtsZ 蛋白，以作用于细菌分裂特定过程类似的方式参与质体的分裂。

17.21　叶绿体以大气中的 CO_2 为原料制造养料

关键概念

- 光合作用发生在称为叶绿体的特殊质体内。
- 叶子使光吸收最大化以促进光合作用。
- 叶肉细胞形态使气体交换量最大化。

在本章的第一节，我们已经清楚植物由于细胞壁的存在限制了细胞获取食物的方式。

一个不能移动的细胞无法追逐或搜寻食物，细胞壁也阻止了细胞吞噬能够在胞内消化的食物颗粒。细丝状的真菌（也有细胞壁）解决这个问题的方式是通过分泌酶，将其细胞周围的有机物降解成足够小的分子，能穿过细胞膜被转运到胞内。植物建立了另一种不同的解决方案：它们获得了捕捉光的能力，并利用其作为能源。这使其摆脱了寻找食物和从环境中吸收和消化物质的需求。取而代之的是植物利用捕获的光子能量聚合空气 CO_2 中单个碳原子形成糖的碳链。光合作用聚合的糖类可以作为能源在体内运输和贮存，也可以通过代谢形成其他有机物例如脂质的碳链。光合作用衍生的碳源主要是供给多种以含碳为主的细胞壁多糖，特别是纤维素——地球上最丰富的生物高聚物。生物体合成自身需要食物的能力称为自养作用，正是自养使植物具备营固定生活方式的能力。

在细胞水平上，光合作用发生在叶绿体这一植物细胞所特有的高度特化的膜结构细胞器内。植物叶片和附属的针刺中的细胞含有许多叶绿体，有时叶绿体蛋白甚至能占到叶片总蛋白的一半以上。为了适应它们的功能，叶绿体的结构十分复杂，内部含有两种间隔：类囊体膜和环绕四周的流动基质。类囊体膜折叠成的堆状结构称为基粒，基粒由延伸的管状膜连成一个连续统一体。光合色素（叶绿素）和相关的酶集中在这些膜上参与光合作用的初始反应，而其他重要反应发生在基质中。叶绿体通过将蛋白集中在折叠的膜系统大大增强了对光的捕获能力。

参与光合作用的组织和细胞的结构通常都是特化的，以便促进光合作用进程。叶子薄而平，且含有少数几层细胞，因此可将含有叶绿体的细胞铺展在一个宽敞的区域。这种组织方式可使细胞最大程度地暴露于光照下，光合作用发生在叶片内部的叶肉细胞。与其他植物细胞不同，叶肉细胞在发育过程中就尽量彼此分离开，形成无规则的、多分支形状的细胞，并在叶片内形成大气室。图 17.60 显示这类细胞在叶片内的组织结构。细胞间的空气经过气孔与外界空气连通，气孔形态见图 17.61。像植物体内其他的形态决定过程一样，表层微管参与了叶肉细胞形态建成。细胞开始分化时，其上均匀分布的表层微管束连在一起产生环绕细胞的微管带。有微管带位置的细胞膨胀被抑制了，但细胞仍能在微管带间凸出来，产生一个不规则的、具有多个圆裂片形状的细胞。圆形突出的裂片增加气体交换的有效表面积，释放光合作用产生的（O_2）并获得所需要的（CO_2）。

细胞内叶绿体的分布经常依据细胞所能接受的光线的方向或密度而进行调整。为了捕获更多的光线，叶绿体能沿着光线入射面的细胞表面成行排列，而为避免光线过强而减少吸收，也能移动到与之平行的另一面。这样的移动是需要微丝纤维的。尽管目前还不知道光线是如何影响微丝骨架的，但是已经认识到细胞质中存在着可以识别光线强弱的光响应感受器。

17.22 展望

拟南芥基因组序列的公布极大地推动了植物细胞学和发育生物学的发展。现在，鉴定那些与已经在酵母和动物细胞内深入研究过的基因的同源基因成为可能。植物学家将继续进行植物体内编码蛋白功能的编目研究。但是无论如何，不是所有的植物蛋白都与其他真核生物的蛋白具有高度的同源性，甚至有些蛋白可能具有不同的用途。

巨大挑战之一是不仅要确定一个蛋白的定位，而是要弄清它作为复合体的一部分如何行使功能。植物生物学中一个重要的例子就是纤维素合成方向的控制。这不仅涉及对

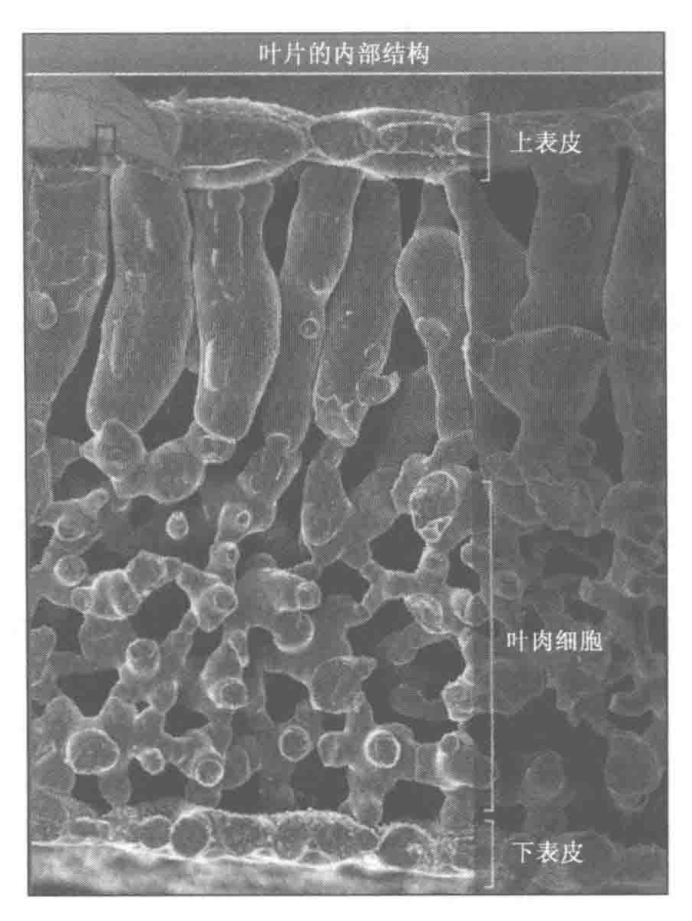


图 17.60　豆科植物叶片横切面的扫描电镜照片。水平排列、紧密连接的薄层细胞构成叶片的上和下表皮组织。其内部充满了无规则形状的叶肉细胞，其细胞壁与相邻细胞脱离且有很少的联系。叶肉细胞间隙汇成了整个叶片内的巨大空间，保证了光合作用期间高效率的气体交换。照片复制自 Jeffree，C. E.，et al. 1987. *Planta* 172：20-37。

纤维素合成酶复合体颗粒所有组成酶的特征的了解，以及它们与膜脂质的关系，还需要确切地知道细胞骨架是如何影响颗粒的移动。细胞骨架和酶复合体颗粒二者之间有还是没有直接的联系？借助先进的成像技术，同步标记纤维素合成酶颗粒和微丝或微管成为可能。但随后的是一个长期未解决的问题，即细胞骨架的方向是如何确定的。先进的成像技术已经揭示出纤维素合成酶正是沿着微管轨道移动的，但进一步的工作是要确定两个系统间是否存在着物质的联系。

后基因组时代的另一个巨大挑战是认识细胞壁如何聚集组装和行使功能的。问题在于占细胞壁组分很大比例的复合多糖，因为其链中的单糖可以分支和连接，形成数量惊人的复杂连接。我们不仅需要知道这些多糖如何先被合成，然后互相作用形成细胞外基质，还需要知道为什么不同细胞壁——甚至同一细胞不同侧面的细胞壁——具有的不同多糖组分。

细胞分裂面控制的研究使细胞生物学进入了发育生物学领域。这里面有一个特别的问题，就是前早期带如何规划细胞分裂面的位置。是否留下了某种“分子标记”（如高浓度质膜相关的细胞骨架结合蛋白）被向外生长的成膜体中相关的细胞骨架探测到？但是比细胞分裂面如何形成更重要的问题是细胞分裂面怎样才能在不同区域内协调一致。是成形素控制分裂面的排布吗？植物激素的影响能超越单个细胞的界限吗？或许在一种组织的很大区域内引发张力的自然力也涉及其中？

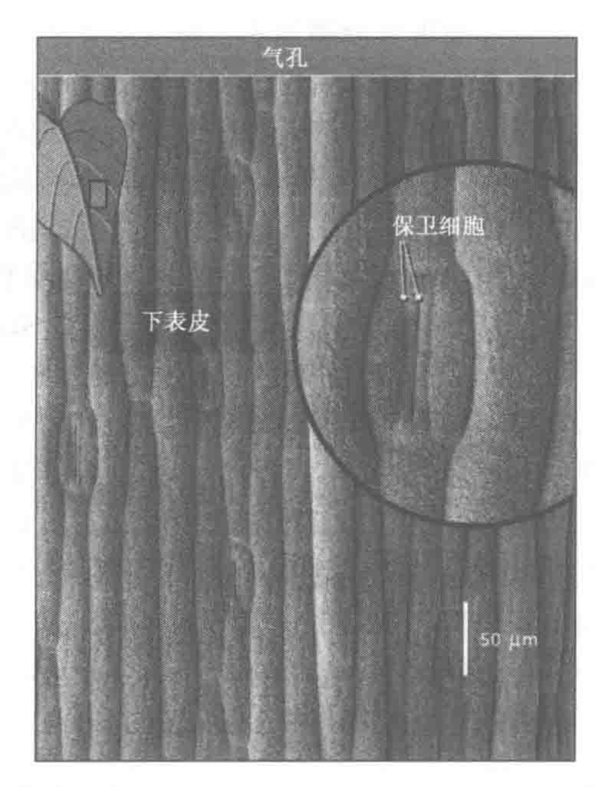


图 17.61　燕麦叶片下表皮组织的扫描电镜照片，显示表面均匀的气孔。每个气孔由表皮中四个特化的细胞构成。插图显示一个高度放大的气孔。位于每个气孔中央的开口是叶片内部和周围环境之间气体交换的通道。气孔能根据环境条件变化而张开或关闭。气孔在叶片表面的密集分布使气体交换更加有效。照片由 John Inne 中心的 Kim Findlay 惠赠。

我们现有知识最大的缺口之一是关于植物激素行使功能的途径。我们需要知道分生组织中细胞分裂与膨胀之间的平衡如何被调节，当成熟细胞被诱导重返细胞分裂时（受创伤后），设想的激素控制如何进行再调整。还有环境影响因素，例如光照和重力，如何转化为生长和形态变化？细胞骨架响应似乎发生在外触发器的初始感受和形态学响应之间的某处；或许对植物激素对细胞骨架原初影响的信号链有了更多认识后会有更深的理解。这很可能涉及多种细胞信号途径。

17.23　总结

植物和动物细胞以截然不同的方式生长和生活。它们之间的不同是因为每个植物细胞包裹着坚韧的细胞壁，阻止了细胞的运动或形状改变。植物细胞通过利用独特的细胞器——叶绿体制造自身的食物来弥补其无法移动的不足；叶绿体能将 CO_2 转化为可被代谢利用或用于构建细胞壁多聚体的化合物。坚硬的细胞壁迫使植物细胞营固定生活方式，但也赋予细胞更多的强度和形状。植物细胞通过组建和重塑细胞壁来确定细胞生长的方向并决定细胞的形态。

与动物细胞不同的是植物的生长贯穿其一生。被称为分生组织的小细胞群持续分裂产生生长需要的新细胞。根尖和芽尖的初级分生组织可增加植物的高度，其周围侧生的次级分生组织使植物厚度增加。茎尖分生组织反复产生细胞模块，每个新形成的模块都在先前一个的上方，组成了包括叶芽或花芽及支撑它们的茎部分的顶端生长点。这种生长方式受环境影响，使植物的外形终生处于变化之中。尽管促使植物生长的细胞分裂仅

发生在特定区域，但许多植物细胞保留分裂能力，并在必要的时候能产生新的器官甚至完整的新植株。

在初级分生组织的细胞经历一系列的分裂和延伸，沿着植物的纵轴产生细胞纵列。坚硬的细胞壁阻碍了像动物细胞那样的收缩分裂。植物细胞代之以由内部构建横穿细胞的新壁——细胞板。细胞分裂面的位置由早前期带预定；早前期带是由微管和微丝纤维构成的表层带，在有丝分裂开始之前产生并消失，但是在此过程中以某种方式标记了细胞表层。在具有大液泡的细胞内，一薄层细胞质——隔膜——与早前期带联动同时产生，横穿细胞，但是维持在整个有丝分裂期，并允许在其中形成有丝分裂纺锤体和细胞板。

植物细胞分裂的结构中有一个与动物细胞相匹配的是有丝分裂纺锤体。但是不管怎样，由于植物细胞内缺乏中心粒和中心体，其纺锤体通常具有宽得多的两极。纺锤体使有丝分裂后期完成后，成膜体——植物的细胞动力装置，出现在分离的染色体之间。成膜体由方向相反且末端重叠的微管束组成。来自于高尔基体的囊泡沿着微管运动并在其重叠的狭小区域融合，形成细胞板。细胞板由细胞中心向外生长，最后到达细胞边缘并与母细胞壁融合。在细胞板形成过程中，内质网管被截留并穿过细胞板，产生连接两个子细胞原生质和物质交流的通道——胞间连丝。

顶端分生组织的较老细胞停止分裂后开始伸长，使其通常比原初体积大许多倍。分裂后细胞随即大幅度地伸长，推动了植物生长点向外部环境中拓展。伸长是以渗透吸水为基础的，过量的水分储存于液泡——植物所特有的膜围成的细胞器，其体积可达到细胞的95%。膨胀液泡产生的压力——称为膨压——被细胞壁中具有高强度张力的纤维素微纤丝所拮抗。由于纤维素非随机的方向性使膨压被转化为一种具有方向性的力。纤维素以垂直细胞生长轴的方向缠绕细胞提供了“铁环加固”，从而阻止了细胞宽度的增加，使膨胀沿其生长轴发生，导致细胞伸长。纤维素由嵌在质膜的多酶复合体合成，并立即组装成微纤丝。细胞壁内坚硬、强壮的纤维素微纤丝由交联多糖相互连接，这些纤维性组分由果胶质形成的凝胶所包裹。除了以上三种类型的多糖，细胞壁还含有结构性蛋白和酶。蛋白延展素可打断相邻微纤丝间的连接，使其彼此分开，从而使细胞壁重塑。

细胞壁内纤维素微纤丝的方向通常与附着在细胞质膜内表面的表层微管一致。这被认为是微管引导纤维素合成酶颗粒在质膜表面的运动，紧随其后形成微纤丝。植物细胞的微管并不像动物细胞那样从一个中心点放射状形成，而是在散布整个细胞表层（包括细胞核周围）的多个成核位点上形成。这种间期微管排列的分布与扩展中细胞表面的新细胞壁合成相一致。表层微管彼此平行排列并具有高度动态性，使整个微管分布可以重排。这种重排通常伴随着细胞延伸方向的改变。这样的重新组合可在光照和重力刺激下，通过植物生长激素的某种调节方式完成。

植物细胞的分泌系统也是分散存在的。与动物细胞只有单个高尔基体不同，植物细胞有散布整个细胞的多个高尔基体。这种分散排布能支持细胞延展时形成的广大表层区域对新质膜和壁组分的需要。高尔基堆沿微丝束环绕细胞移动。植物细胞内的微丝纤维与所有不同的微管都呈平行性排列，但是也以能覆盖细胞内广大区域的大微丝束的形式单独存在。这些支持了细胞内细胞器和囊泡通过胞质环流的过程进行持续而活跃的运动。这种移动似乎是由移动颗粒表面的肌球蛋白所推动的。

细胞分化发生在伸长之后，这可以木质部细胞的形成为例来说明。沿着生长轴中心的纵列细胞经历程序性细胞死亡、末端细胞壁降解，形成能够从根部向植物顶端输导水

分和可溶解的营养物的连续管道。细胞死亡前，它们的表层微管束联合起来引导细胞壁的特化加厚，这将强化每一个管道，防止其崩裂。与在伸长细胞中的初生细胞壁不同，这种在已分化细胞中形成的次级细胞壁，具有额外的纤维素层，并通过像木质素类分子的化学修饰得到强化，并拥有防水特性。

尽管大多数植物细胞通过扩散伸展的方式生长，但有些细胞像根毛和花粉管，就是通过狭小延伸位点的定向分泌而得到伸长，这种延伸途径就是熟知的顶端生长。该位点延伸形成管状体，而生长仅发生在它的顶端。微管和微丝纤维均沿着管体长轴排布，微丝纤维运输囊泡到顶端，驱动其生长。

植物含有称为质体的独特的细胞器。细胞分化期间，非特化的前体细胞器——前质体——依赖所在细胞类型可分化形成多种不同质体。有色体像成色素细胞一样给予花的颜色；无色素的淀粉体储存淀粉。质体在进化过程中，由原始真核细胞吞噬的光合原生生物而起源。质体具有原核生物祖先直接反映在这样两个事实：质体的蛋白质和遗传元件与现存细菌非常接近。最普遍的质体类型是叶绿体。叶绿体因其功能需要而高度特化，具有非常精巧的内部膜结构——叫作基粒——是光合作用的初始反应场所。

参 考 文 献

17.2 植物怎样生长

综述

Fletcher, J. C., 2002. Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* v. 53 p. 45–66.

17.3 分生组织以重复方式提供新的生长模式

综述

Fletcher, J. C., 2002. Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* v. 53 p. 45–66.

Sussex, I. M., and Kerk, N. M., 2001. The evolution of plant architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 4 p. 33–37.

17.4 细胞分裂面对组织形成是十分重要的

综述

Costa, S., and Dolan, L., 2000. Development of the root pole and cell patterning in *Arabidopsis* roots. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 10 p. 405–409.

Gunning, B. E. S., Hughes, J. E., and Hardham, A. R., 1978. Formative and proliferative cell divisions, cell differentiation and developmental changes in the meristem of *Azolla* roots. *Planta* v. 143 p. 121–144.

研究

Pickett–Heaps, J. D., and Northcote, D. H., 1966. Cell division in the formation of the stomatal complex of the young leaves of wheat. *J. Cell Sci.* v. 1 p. 121–128.

Smith, L. G., Hake, S., and Sylvester, A. W., 1996. The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* v. 122 p. 481–489.

17.5 有丝分裂前的细胞质结构预定了细胞分裂的方向

研究

Brown, R. C., and Lemmon, B. E., 2001. The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma* v. 215 p. 35–49.

Dixit, R., and Cyr, R. J., 2002. Spatio-temporal relationship between nuclear-envelope breakdown and preprophase band disappearance in cultured tobacco cells. *Protoplasma* v. 219 p. 116–121.

Goodbody, K. C., Venverloo, C. J., and Lloyd, C. W., 1991. Laser microsurgery demonstrates that cytoplasmic strands anchoring the nucleus across the vacuole of premitotic plant cells are under tension. Implications for division plane alignment. *Development* v. 113 p. 931–939.

Traas, J. A., Doonan, J. H., Rawlins, D. J., Shaw, P. J., Watts, J., and Lloyd, C. W., 1987. An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. *J. Cell Biol.* v. 105 p. 387–395.

17.6 植物有丝分裂没有中心体

综述

Schmit, A. C., 2002. Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* v. 220 p. 257–289.

研究

Dixit, R., and Cyr, R. J., 2002. Spatio-temporal relationship between nuclear-envelope break-

down and preprophase band disappearance in cultured tobacco cells. *Protoplasma* v. 219 p. 116–121.
Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., and Karsenti, E., 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* v. 382 p. 420–425.
Mazia, D., 1984. Centrosomes and mitotic poles. *Exp. Cell Res.* v. 153 p. 1–15.

17.7 细胞分裂的动力学结构复合体在早前期预成的细胞板处构建新的细胞壁

综述
Verma, D. P., 2001. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 52 p. 751–784.

17.8 胞质分裂期的分泌物形成细胞板

综述
Nebenführ, A., and Staehelin, L. A., 2001. Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends Plant Sci.* v. 6 p. 160–167.
Staehelin, L. A., and Hepler, P. K., 1996. Cytokinesis in higher plants. *Cell* v. 84 p. 821–824.
Verma, D. P., and Hong, Z., 2001. Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* v. 47 p. 693–701.

研究
Cutler, S. R., and Ehrhardt, D. W., 2002. Polarized cytokinesis in vacuolate cells of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 99 p. 2812–2817.
Gu, X., and Verma, D. P., 1996. Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J.* v. 15 p. 695–704.
Verma, D. P., 2001. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 52 p. 751–784.
Völker, A., Stierhof, Y. D., and Jürgens, G., 2001. Cell cycle-independent expression of the *Arabidopsis* cytokinesis-specific syntaxin KNOLLE results in mistargeting to the plasma membrane and is not sufficient for cytokinesis. *J. Cell Sci.* v. 114 p. 3001–3012.

17.9 胞间连丝是连接植物细胞的通道

综述
Heinlein, M., 2002. Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 5 p. 543–552.

研究
Reichelt, S., Knight, A. E., Hodge, T. P., Baluska, F., Samaj, J., Volkmann, D., and Kendrick-Jones, J., 1999. Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post–cytokinetic cell wall. *Plant J.* v. 19 p. 555–567.

17.10 细胞膨大由液泡膨胀所驱动

综述
Bassham, D. C., and Raikhel, N. V., 2000. Unique features of the plant vacuolar sorting machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 12 p. 491–495.
Bethke, P. C., and Jones, R. L., 2000. Vacuoles and prevacuolar compartments. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 3 p. 469–475.
Peters, W. S., Hagemann, W., and Deri Tomos, A., 2000. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in "soft" plant tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* v. 125 p. 151–167.

17.11 膨压的巨大压力由细胞壁内的强力微纤维所抵挡

综述
Peters, W. S., Hagemann, W., and Deri Tomos, A., 2000. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in "soft" plant tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* v. 125 p. 151–167.
Reiter, W. D., 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 5 p. 536–542.

17.12 细胞壁需要松弛和重塑以适应细胞生长

综述
Cosgrove, D. J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* v. 407 p. 321–326.

研究
Marga, F., Grandbois, M., Cosgrove, D. J., and Baskin, T. I., 2005. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: Evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant J.* v. 43 p. 181–190.
McQueen-Mason, S. J., Fry, S. C., Durachko, D. M., and Cosgrove, D. J., 1993. The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in-vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls. *Planta* v. 190 p. 327–331.

17.13 纤维素在原生质膜合成，而不像其细胞壁组分那样预合成组装后分泌

综述
Brett, C. T., 2000. Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int. Rev. Cytol.* v. 199 p. 161–199.
Brown, R. M., Saxena, I. M. and Kudlicka, K., 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Sciences* v. 5 p. 149–156.
Verma, D. P. and Hong, Z., 2001. Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* v. 47 p. 693–701.

17.15 原生质表层微管具有高度动态性，能改变自身的方位

综述

Lloyd, C., and Chan, J., 2004. Microtubules and the shape of plants to come. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 13–22.

Schmit, A. C., 2002. Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* v. 220 p. 257–289.

研究

Burk, D. H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W. H., and Ye, Z. H., 2001. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* v. 13 p. 807–827.

Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H., and Lloyd, C. W., 2003. EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* v. 5 p. 967–971.

Chan, J., Jensen, C. G., Jensen, L. C., Bush, M., and Lloyd, C. W., 1999. The 65-kDa carrot microtubule–associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 96 p. 14931–14936.

Dixit, R., and Cyr, R., 2004. Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle–dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* v. 16 p. 3274–3284.

Shaw, S. L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D. W., 2003. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* v. 300 p. 1715–1718.

Yuan, M., Shaw, P. J., Warn, R. M., and Lloyd, C. W., 1994. Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 91 p. 6050–6053.

17.16 散布的高尔基系统运输囊泡至细胞表面以利细胞生长

综述

Sanderfoot, A. A., and Raikhel, N. V., 1999. The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell* v. 11 p. 629–642.

Staehelin, L. A., 1997. The plant ER: A dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* v. 11 p. 1151–1165.

Staehelin, L.A., and Moore, I., 1995. The plant Golgi apparatus: Structure, functional organization, and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v. 46 p. 261–288.

研究

Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C., 1998. Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* v. 15 p. 441–447.

Vitale, A., and Denecke, J., 1999. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* v. 11 p. 615–628.

17.17 微丝纤维形成网络担负细胞的物质运输

综述

McCurdy, D. W., Kovar, D. R., and Staiger, C. J., 2001. Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma* v. 215 p. 89–104.

研究

Reichelt, S., Knight, A. E., Hodge, T. P., Baluska, F., Samaj, J., Volkmann, D., and Kendrick–Jones, J., 1999. Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J.* v. 19 p. 555–567.

17.18 木质部细胞的分化形成需广泛的特化

综述

Roberts, K., and McCann, M. C., 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 3 p. 517–522.

17.20 植物细胞具有称作质体的特有细胞器

研究

Pyke, K. A., 1999. Plastid division and development. *Plant Cell* v. 11 p. 549–556.

17.22 展望

研究

Tabata, S., et al., 2000. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* v. 408 p. 823–826.

张根发　译

词　汇　表

10nm 纤维(10nm fiber)：一种由自然状态的染色质折叠成的核小体线性阵列。

30nm 纤维(30nm fiber)：一种核小体组成的螺旋管结构，是染色质中由核小体组成的基本单位。

Cyclin B/cdk1：一种胞质酶，当它激活时，促使细胞进入有丝分裂。它由 Cdk1 激酶和其 cyclin B 调节亚基组成。当 cyclin B 被降解，该酶失去活性，从而使得细胞结束有丝分裂。

G_0 期：细胞停止分裂的非周期状态。

G_1 期：真核细胞周期中上一次有丝分裂和 DNA 复制起始之间的时期。

G_2 期：细胞周期中处于细胞染色体的复制(S 期)和随后的有丝分裂(M 期)之间的时期。

n－1 规则(n－1 rule)：雌性哺乳动物细胞中仅有一条 X 染色体是激活的，而其他则处于非活化状态。

***N*-连接糖基化(*N*-linked glycosylation)**：蛋白进入内质网后，糖基基团共价连接到该蛋白的天冬酰氨残基上。

ADP-核糖基化因子(ARF)：COPⅠ包被的组成之一，最初被鉴定为霍乱毒素活性的一种辅助因子。

COPⅠ被膜(COPⅠcoat)：由衣被和 ADP-核化因子组成。COPⅠ被膜小泡是从高尔基复合体胞浆面出芽形成的运输囊泡，调节高尔基复合体向内质网的逆向运输。COPⅠ被膜小泡也可能调节高尔基囊泡之间的运输。

COPⅡ被膜(COPⅡ coat)：由一个 GTPase 和两个异二聚体构成的蛋白复合体组成。COPⅡ被膜小泡是从粗面内质网胞质面出芽形成的运输囊泡，调节从内质网到高尔基体的顺行运输。

C-带(C-band)：通过染色技术使着丝粒着色而呈现的带型，着丝粒形似一个黑色斑点。

Exocyst：位于胞膜分泌位点的一种由八种蛋白组成的复合体。在膜融合过程中，它使分泌囊泡定位到膜。

FG-重复 (FG-repeat)：存在于约 1/3 的核孔蛋白中，被短的间隔序列分开的重复拷贝中由四或五个氨基酸残基组成的位点。

F-肌动蛋白(F-actin)：聚合的肌动蛋白纤维。

Gemini body(GEM)：一种亚核结构，通常与卡侯氏体相邻并与其相似，含有特异的蛋白和小 RNA。

G 带(G-band)：真核染色体通过染色所呈现的一系列横条纹，它们被用于核型分析(通过条纹样式识别染色体及其上的区带)。

G 蛋白(G-protein)：鸟嘌呤核苷酸结合调节蛋白，其活化形式与 GTP 结合。通过内在 GTPase 活性将 GTP 水解为 GDP，从而使 G 蛋白失活。异三聚体 G 蛋白由 α、β、γ 亚基组成，结合在细胞膜上，其中 α 亚基与 GTP 结合。单体 G 蛋白是异三聚体 G 蛋

白 α 亚基的同源物，可位于细胞质中或与膜结合。

G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor)：一种由 7 次跨膜螺旋组成的受体蛋白。这种受体蛋白通过催化与其结合的异三聚体 G 蛋白上结合的 GDP 转换为 GTP 从而使其活化。

G-肌动蛋白 (G-actin)：球状肌动蛋白(单体肌动蛋白)。

Hyladherin：与透明质酸结合的细胞表面蛋白。

Karmellae：一些膜蛋白过量表达后，在核周围所形成的内质网堆。

Merotelic attachment：有丝分裂染色体上的动粒接触到有丝分裂纺锤体两极的状态，发生在有丝分裂早期，常在后期开始前被纠正。

mRNA 核糖核蛋白颗粒(mRNP)：成熟 mRNA(剪切后)及其结合蛋白组成的复合体。胞质 mRNP 和核 mRNP 在蛋白组成上有所不同。

M 期(M phase)：真核细胞周期中发生核和胞质分裂的时期。

PDZ 结构域(PDZ domain)：在许多信号转导蛋白中均具有的一种结构域，使得它们能够互相结合。

Rab 效应器(Rab effector)：与结合 GTP 的 Rab 结合的蛋白，帮助执行它们的功能。

Rab 蛋白(Rab protein)：小的 Ras 样 GTPase。不同区室之间的蛋白运输需要不同的 Rab。虽然它们的具体作用不清楚，但初步表明 Rab 能够调节膜的寻靶和融合。

SCF：周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子和其他细胞周期调节因子降解所必需的保守的 E3 泛素连接酶。

Securin：是一种通过结合并抑制分离酶而抑制后期起始的蛋白，分离酶能剪切连系着姐妹染色单体的黏着复合体。当后期促进复合体激活时，securin 被降解，分离酶的抑制被解除。

SH2 结构域(SH2 domain)：能够识别酪氨酸磷酸化位点周围序列的一种约 100 个氨基酸的蛋白结构域，为了高亲和力结合，通常要求相应酪氨酸被磷酸化。

SH3 结构域(SH3 domain)：能够结合特异的短的脯氨酸富集序列的蛋白相互作用结构域，大约由 50 个氨基酸残基组成。

Sigma 因子：细菌 RNA 聚合酶起始转录所必需的一个亚单位，主要影响启动子的选择。

SNARE：向胞质辐射的一种膜蛋白，调节膜的融合。一种膜上的 SNARE 与另一种膜上的同类 SNARE 之间的特异相互作用促使膜充分接近至融合。

SNARE 假说(SNARE hypothesis)：认为膜囊泡到靶膜的特异定位受 SNARE 蛋白之间的相互作用调节。该假说认为，囊泡膜上的 SNARE 特异地与靶膜上的同类 SNARE 结合。

Speckle：一种染色质间区颗粒，可能是储存剪切体成分或帮助其装配的结构。

SPR 受体(SPR receptor)：内质网膜内的一种蛋白，与信号识别颗粒(SPR)结合，调节共翻译转运过程中分泌蛋白或膜蛋白的定位。

SWI/SNF：一种染色质重塑复合体，利用 ATP 水解的能量改变核小体的组织结构。

Syntelic attachment：姐妹动粒结合在同一纺锤体极的状态。这种错误在纺锤体形成早期经常发生，但后期开始前都被纠正。

S 期(S phase)：真核细胞周期中 DNA 的复制期。

Tether：提供锚定运输囊泡到靶膜的起始途径的蛋白，两个典型的类型是长的纤维蛋白和大的蛋白复合体。

TIC 复合体(TIC complex)：调节蛋白通过叶绿体内膜的转运的多蛋白复合体。

TIM 复合体(TIM complex)：位于线粒体内膜，与蛋白从膜间隙运输到细胞器有关。

TOC 复合体(TOC complex)(叶绿体外侧易位 TOP)：调节蛋白通过叶绿体外膜的跨膜转运的多蛋白复合体。

TOM 复合体(TOM complex)：位于线粒体外膜，与蛋白从胞质溶胶运输到内外膜间隙有关。

Z 环(Z ring)：位于原核细胞的胞膜下的分裂位点形成的蛋白复合体，参与胞质分裂。

α-连锁蛋白(α-catenin)：一种在钙黏素受体复合体中与β-连锁蛋白和肌动蛋白纤维相结合的接头蛋白。

β-连锁蛋白 (β-catenin)：一种与钙黏素和α连锁蛋白相结合的接头蛋白。它还参与 Wnt 信号通路。

γ-微管蛋白 (γ-tubulin)：微管蛋白亚家族成员之一。它还定位在中心体，与其他蛋白构成一种复合体使微管成核。许多细胞的γ-微管蛋白还有其他定位。

γ-微管蛋白环状复合体 (γ-tubulin ring complex)：一种包含γ-微管蛋白的大约 10 种蛋白构成的复合体。它是中心体的一部分，能够使微管成核。

癌(carcinoma)：来自内皮细胞(形成皮肤或衬于内部器官管或腔)的恶性肿瘤。

氨基多糖(glycosaminoglycan)：由重复的二糖单位组成的糖多聚体。经常结合在蛋白多糖的核心蛋白上。

巴尔比亚尼环(Balbiani ring)：位于多线染色体一些特异带区的极大膨泡或激活转录区。

巴尔比亚尼环颗粒(Balbiani ring granule)：一些特异的极大的前体 mRNA 及其结合蛋白。这些前体 mRNA 由发育过程中激活的摇蚊（*Chironomus tentants*）基因转录而来。所形成的 mRNP 单位像一个环状大分子结构。

白色体 (leucoplast)：一种合成和积累各种类型小的有机分子的质体。

白血病(leukemia)：来自骨髓的白细胞的一种癌症状态。依据白细胞正常的细胞起源可分为淋巴细胞性，髓细胞性和红系细胞性白血病。

板状伪足(lamellipodia)：当细胞沿某表面移动时，在其前进边缘所形成的突起，包含动力肌动蛋白网络。

半纺锤体(half-spindle)：有丝分裂纺锤体赤道板的一侧的区域。纺锤体的两极中，每极组成一个半纺锤体。

半胱天冬酶 (caspase)：一种半胱氨酸天冬氨酸特异性的蛋白酶。许多种半胱天冬酶参与细胞凋亡。

半桥粒(hemidesomsome)：将胞内的中间纤维通过细胞表面的整合素(整联蛋白)与基膜相连的细胞连接。

包被(envelope)：围绕一些细胞器(如核与线粒体)和细胞(如原核细胞)的膜，通常由脂双层组成。原核细胞包被由质膜和其胞外层(细胞壁、胞外膜、荚膜)组成。胞外层的数量和组成取决于原核生物的类型。

包被蛋白(coat protein)：一种多蛋白复合体，直接或间接结合于运输膜泡上的整合蛋

白。这些蛋白复合体的侧向关联使得膜变形出芽，逐渐形成囊泡。

孢子形成(sporulation)：细菌或酵母细胞产生孢子。

胞间连丝(plasmodesmata)：连接相邻植物细胞细胞质的通道，允许细胞间的物质传递。每一根胞间连丝由延伸在细胞间的胞膜所形成的管组成，其通道中央还有内质网延伸形成管道。

胞内体(endosome)：一种参与物质分选的胞包绕的细胞器，接受来自内吞或反面高尔基体网的分子，然后转运到其他区室，如溶酶体。

胞吐作用(exocytosis)：细胞将在内质网最初合成的颗粒分子分泌到胞外的过程。胞吐作用是通过分泌囊泡与胞膜的融合实现的。

胞饮 (pinocytosis)：内吞作用的一种，细胞通过各种大小的囊泡吸收溶解在胞外液体基质中的物质。

胞质分裂(cytokinesis)：有丝分裂末期，当染色体分离之后，一个细胞的细胞质一分为二的过程。在动物细胞中，胞质分裂发生在染色体被纺锤体分离形成两个独立的核之后。

胞质环流(cytoplasmic streaming)：植物细胞的胞质中的细胞器和颗粒成分的一种运动混合过程，建立在肌动蛋白微丝的基础之上。

胞质溶胶(cytosol)：指一个细胞的细胞器周围的胞浆的液体，也指细胞匀浆 100 000*g* 离心 1 h 之后所得到的上清液。

被膜小泡(coated vesicle)：由膜上的被膜小窝缢缩而成。被膜小泡有表面蛋白，如网格蛋白、COPⅠ、COPⅡ。

被膜小窝(coated pit)：膜内陷而成的小窝，然后收缩成有被小泡。

鞭毛 (flagellum)：参与细胞迁移的鞭状结构。细菌的鞭毛是从其表面延伸的丝状结构。真核生物的鞭毛包含一微管阵列，而且是镶嵌在胞膜中的。

鞭毛内转运(intraflagellar transport)：分子复合体向轴丝的末梢或近端基底移动。移动发生在轴丝周围的胞膜下，是运输新的轴丝成分供鞭毛生长所必需的。

表观变化(epigenetic change)：不改变基因型而影响表型的变化。它包括可遗传的细胞性状变化而并不表示遗传信息的改变。

别构调节(allosteric regulation)：一种蛋白的某个位点结合一小分子或另一种蛋白使其构象发生变化从而改变其活性。

病原菌(pathogen)：导致另一种有机体患病的一种有机体。

玻璃粘连蛋白(vitronetin)：在血流里循环的一种多功能胞外基质蛋白，在调节凝血块形成中起核心作用。

不可逆点 (point of no return)：细胞周期中的一个过渡点，一旦通过，将不可逆地使细胞进入下一时期。例如，当细胞通过晚 G_2 期不可逆点时便进入有丝分裂。

布朗棘齿模型 (Brownian ratchet model)：蛋白通过通道以翻译后转移的方式扩散进入内质网。向内扩散是无障碍的，而向外扩散是由内质网内的 BiP 控制的。

部分激动剂(partial agonist)：一种专一性结合到活化受体的配体，但只促进其部分激活，因为其对活化形式的选择性是适度的。

层粘蛋白(laminin)：在许多组织类型的基膜处富集的细胞外基质蛋白。层粘蛋白形成

网络状结构而不是纤维。

常染色质(eukaryote)：包括中期核内的大部分基因组，比异染色质松弛，包括大多数活化或潜在活化的单拷贝基因。

超敏位点(hypersensitive site)：位于染色质上的一个很短的区域，对 DNAase Ⅰ 和其他核酶的裂解极度敏感，它组成一个将核小体排除在外的区域。

沉默(silencing)：基因表达被抑制，通常是由于染色质结构的变化引起的。

成核(nucleation)：聚合反应中的一步，一种小的聚合体的形成使得延伸得以进行。例如，微管和微丝装配过程中首先要成核。

成核蛋白(nucleating protein)：细胞中帮助起始和控制多聚体形成的一类蛋白质，如肌动蛋白纤维的聚合。Arp2/3 和 formins 是两类主要的成核蛋白复合体。

成膜粒(phragmosome)：许多植物细胞含有液泡，占据细胞的大部分空间，有丝分裂时形成的一种穿过液泡的细胞质薄片结构称为成膜粒。有丝分裂纺锤体和新细胞壁均在成膜粒内形成。

成膜体(phragmoplast)：一种以微管为基础的结构，植物细胞有丝分裂后期引导新细胞壁形成，将其一分为二。

成熟弹性蛋白(mature elastin)：被赖氨酰氧化酶修饰的弹性蛋白，被装配为弹性纤维。

成熟蛋白(mature protein)：已经去除信号序列的分泌蛋白或膜蛋白。

程序细胞死亡(programmed cell death)：发育过程中确定时间点发生的细胞死亡。

初级纺锤体(primary spindle)：有丝分裂早期，核膜崩解前，来自两中心体的微管相互作用形成纺锤体样微管排列。

初级纤毛(primary cilium)：位于几乎所有细胞上的单一而大的纤毛。在一些特化的感觉细胞里，初级纤毛被高度修饰作为一种感应结构。

初级主动运输(primary active transport)：载体蛋白将 ATP 水解的能量和溶质逆电化学梯度的运输耦联。这些载体蛋白帮助维持跨膜的溶质梯度。

初生蛋白(nascent protein)：尚未完成合成的蛋白质，其多肽链仍然通过 tRNA 依附在核糖体上。

次级主动运输(secondary active transport)：载体蛋白利用储存在跨膜电化学梯度中的自由能驱动物质的运输。

刺端(barbed end)：微丝快速伸长的一段。由于在电镜下肌球蛋白包被肌动蛋白纤维呈现的特殊形状而命名。

粗面内质网(rough endoplasmic reticulum)：结合有核糖体的内质网，是膜蛋白和分泌蛋白的合成位点。

带状粘连(zonula adherens)：围绕上皮细胞或内皮细胞的带状细胞-细胞连接，存在于接合复合体中。

单 X 假说(signal X hypothesis)：雌性哺乳动物中一条 X 染色体处于抑制状态。

单倍体(haploid)：每一常染色体和性染色体只具有一个拷贝的染色体组，单倍体数 n 以二配体生物的配子为特征。

单层(monolayer)：培养的真核细胞生长成单细胞层。

单层上皮(simple epithelia)：单层上皮细胞。

单克隆(monoclonal)：所有细胞都来自同一个祖先细胞的细胞群体。

单向(mono-oriented)：有丝分裂或减数分裂染色体的一个动粒接触到有丝分裂纺锤体时染色体的取向。单向是染色体与有丝分裂纺锤体接触的正常过渡状态。

单向转运体(uniporter)：仅将一种类型的可溶性分子进行跨膜转运的载体蛋白。

弹性蛋白(elastin)：一种能对牵拉作出反应而延伸或收缩的细胞外基质蛋白。

蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase)(PDI)：催化内质网腔内蛋白二硫键形成重排的相关蛋白家族成员。

蛋白分选(protein sorting)：引导不同类型的蛋白运输到特定的细胞器。

蛋白聚糖(proeioglycan)：胞外基质中高度糖基化的蛋白，由一个核心蛋白和共价结合的一个或多个氨基多糖链组成。

蛋白纤维(protofilament)：蛋白亚单位形成的线性极化结构。微管和微丝纤维是由平行的蛋白纤维侧向联合而成。例如，αβ微管蛋白异二聚体聚合形成蛋白纤维，13根蛋白纤维组成一根微管的壁。

蛋白脂质体(proteoliposome)：包含蛋白的脂质囊泡，常由溶解在去垢剂中的蛋白和脂质重组形成。

蛋白质结构域：氨基酸序列一段独立的连续区域，由于折叠形成可辨识的三级结构，结构域通常具有独立的功能。

蛋白质寻靶(protein targeting)：蛋白质被选择性地识别然后跨膜转运到相应的位点。

蛋白质转运(protein translocation)：蛋白通过真核细胞细胞器膜或原核细胞质膜的运动，每一种通过蛋白质的膜都有特化的转运通道。

导管成分(tracheary element)：形成植物木质部的管，由于其增厚过程类似于动物气管的增厚而得名。导管成分死亡，它们的端壁溶解而形成中空的管，在根和芽之间进行水和可溶性物质的运输。

灯刷染色体(lampbrush chromosome)：极度延伸的两栖类卵母细胞的减数分裂二价体。

第二信使(second messenger)：当信号转导通路被激活时所产生或释放的一种小分子，如cAMP、Ca^{2+}。

电荷密度(charge density)：单位面积或单位电压的电荷数。

电化学梯度(electrochemical gradient)：跨膜离子浓度差异所造成的电位差，它意味着跨脂双层电荷和化学形态双重差异。

淀粉体(amyloplast)：储藏淀粉的质体。

凋亡(apoptosis)：细胞对一种刺激作出反应，通过激活一些特征性反应启动信号通路导致其死亡。

顶端生长(Tip growth)：一些特化的植物细胞如根毛伸长生长的过程。生长过程起始于细胞壁物质的沉积，新的膜局限于细胞表面一个非常小的区域，形成膨泡，沉积继续仅发生在其顶端，形成一个直径恒定的小管。

顶面(apical)：极性细胞的外表面。例如小肠内皮细胞的顶面即与小肠腔相邻的区域。与此相对应的一面称为基底面。

动力蛋白 (dynein)：向微管负极移动的分子马达。动力蛋白几乎存在于所有细胞的胞质溶胶、纤毛以及鞭毛中。

动力学不稳定性(dynamic instability)：微管在伸长和缩短之间连续转换的过程。

动力学控制(kinetic control)：一个反应和几个反应的选择或反应程度是由其相对反应速率控制的，而不是由反应平衡控制的。

动粒(kinetorchore)：与着丝粒相关的一种蛋白结构，使染色体连接到有丝分裂纺锤体微管。每条有丝分裂染色体包含两个姐妹动粒，分别在两个着丝粒上。

动粒纤维(kinetochore fiber)：将动粒连接到有丝分裂纺锤体极的微管束，也称为染色体纤维或纺锤体纤维。

动态平衡(homeostasis)：一个系统(如一个细胞、器官或有机体)即使其外环境发生变化，仍保持相对恒定的内环境的能力。

动作电位 (action potential)：在可兴奋细胞表面快速而瞬时产生的一种电信号波，如神经细胞、某些肌细胞和内分泌细胞。它是当膜电位达到域值时诱导电压敏感的离子通道的开关产生的。

毒性因子致病因子(virulence factor)：病原菌产生的一种能够使其侵袭宿主，逃避免疫反应而使其致病的分子。

毒性致病性(virulence)：微生物攻克宿主防御机制的程度。

端粒(telomere)：真核染色体的自然末端，由重复的六核苷酸序列及其相关蛋白组成，保护染色体末端防止降解和融合。

端粒沉默(telomeric silencing)：端粒附近的基因活性被抑制。

端粒酶(telomere)：一种核糖核蛋白酶，在端粒处，通过在染色体 DNA 的 3′端引入碱基，合成一条链的重复单位。

多聚糖(peptidoglycan)：细菌细胞壁的主要成分，是由多肽交错而成的糖链多聚体，是维持细胞渗透压和细胞形状所必需的。

多聚唾液酸(polysialic acid)：位于神经细胞黏附分子(NCNM)上的长的线性唾液酸糖链，其存在可以减少神经细胞黏附分子的黏附力。

多泡体 (multivesicular body，MVB)：一种内部积累了许多囊泡形式的晚期胞内体，这些 内在囊泡是由有限的内体膜内卷缢裂而成。

多线染色体(polytene chromosome)：因染色体组连续复制而不分裂形成的染色体。

多线染色体带(bands of polytene chromosome)：多线染色体清晰可见包含大多数 DNA 的浓密区域，它们含有激活的基因。

恶性肿瘤(malignant)：指的是具有局部侵略性能够转移到身体其他部位的肿瘤。

二倍体(diploid)：含有一对同源染色体的细胞。一个二倍染色体组包括每一常染色体的两拷贝和两条性染色体。大多数真核细胞除了配子之外都是二倍体。

二酰基甘油(diacylglycerol)：构成大多数膜磷脂的骨架，它由两个脂肪酸与一个甘油分子共价连接构成。

发动蛋白 (dynamin)：一种参与网格蛋白调节的囊泡形成的胞质溶胶蛋白，是一种 GTPase，尽管发动蛋白的具体功能还存在争议，但其多聚体参与网格蛋白被膜小泡自膜的分离。一种发动蛋白的异型体在线粒体隔膜中行使功能。

发色团(chromophore)：一个分子的光吸收部分。常指一种蛋白的光吸收辅助因子。

发育(development)：从一个受精卵成为一个成熟有机体所发生的一系列变化。

发育异常(dysplasia)：异常细胞生长的早期阶段，细胞和组织结构已经中度异常。

翻译定位(translational positioning)：组蛋白八聚体在连续双螺旋扭曲上的定位，决定了哪些序列定位在连接区。

翻译后转运(posttranslational translocation)：蛋白质合成完成后，从核糖体释放，再转运通过细胞膜。

反面高尔基体网(trans-Golgi network)(TGN)：位于高尔基体反面的相互连接的小管组成的网状结构，是决定分子进入不同囊泡的分选站。

反向激动剂(inverse agonist)：专一性结合到一种受体的非活化形式的配体，然后通过该受体导致信号转导的抑制。

反向运输(retrograde transport)：物质从高尔基体(或质膜)运输到内质网。

反应元件(response element)：位于启动子或增强子中的一段序列，被特异的转录因子所识别。

反转录病毒(retrovirus)：一种类型的 RNA 病毒，能够通过反转录过程将其 RNA 基因组序列转录为 DNA。

泛素(ubiquitin)：一种高度保守的含有 76 个氨基酸残基的蛋白，与其他蛋白共价结合。

纺锤体(spindle)：有丝分裂或减数分裂过程中使染色体分离并使细胞分裂的高度动态结构。纺锤体具有三个主要的结构成分：微管、中心体(动物体内)、染色体。

纺锤体基质(spindle matrix)：分散在有丝分裂纺锤体微管之间的蛋白成分。基质包含 NuMA 蛋白，利用马达蛋白锚定微管，维持纺锤体完整性。基质成分更加集中在纺锤体极附近。

纺锤体极(spindle pole)：有丝分裂过程中，染色体向其运动的区域。正常两极有丝分裂纺锤体每端有一个极。每一极包含一个微管负极的聚合。动物细胞中，极从中心体形成，微管集中每一极的一个紧密点。植物细胞中没有中心体，纺锤体极范围更加宽广。

非连续性细胞黏附(discontinuous cell-cell adhesion)：白细胞快速依附和释放，在血管中进行间歇式滚动。

非整倍性：指的是染色体过多或过少的情况，正常染色体数目的两倍叫做四倍体，正常数目的一半叫做单倍体。

非组蛋白(nonhistone)：染色体中，除了组蛋白之外的结构蛋白。

分隔连接(septate junction)：存在于无脊椎动物中的一种细胞连接，其结构类似于紧密连接，邻近细胞的胞膜紧密相连。

分化(differentiation)：一个细胞特化的过程。

分类学(taxonomy)：有机体命名和分类的科学。

分离酶(separase)：通过裂解或抑制将姐妹染色体保持在一起的黏着复合体从而促进后期启动的一种蛋白酶。

分泌颗粒(secretory granule)：是一种膜包被的区室，含有调节型胞吐作用时(也就是分子被集中储存在分泌颗粒中，只在信号刺激下才释放)从细胞释放的分子。

分泌通路：见外排通路。

分生组织(meristem)：植物中一种小的高度有组织的区域，该区细胞分裂使得植物生

长。分生组织位于植物的根和芽的顶端，分裂产生的细胞增加了植株的高度。植物圆周的其他分生组织使得植物长粗。

分选信号(sorting signal)或靶信号：蛋白中使其能够从一个部位运输到细胞中的另一个部位的序列。分选信号由短的氨基酸序列或共价修饰组成。

分子伴侣(chaperone)(也叫伴娘蛋白)：与不完全折叠或装配的蛋白结合从而帮助它们折叠或防止它们聚集的一种蛋白质，之后与底物分离。

浮游生物(planktonic organism)：能自由移动的有机体。

辅助因子(cofactor)：一种无机或有机的小分子，是一种酶保证正常结构和功能所必需的。

复层上皮(stratified epithelia)：具有多层上皮细胞。

复制体(replisome)：装配在复制叉以合成 DNA 的蛋白复合体。

钙黏素(cadherin)：一种细胞表面受体，常形成二聚体，参与细胞间黏附。一些钙黏素存在于黏合连接中。

干细胞(stem cell)：相对未分化的细胞，能够继续分裂产生更多未分化或特化的细胞。在许多有机体中，不同类群的干细胞产生不同的细胞系。

高尔基器(Golgi apparatus)：从内质网接收新合成的蛋白质然后对其进行加工，再转运到其他目的地的一种细胞器，由许多排列成堆的扁平膜组成。植物含有大量的高尔基器，称为分散高尔基器。高尔基器的主要特征是包含扁平、膜包被的池状结构，在一些细胞中还成堆排列，高尔基堆对运输颗粒的翻译后修饰起作用。

高甘露糖寡糖(high mannose oligosaccharide)：一种氮连接的寡聚糖，包含仅连接甘露糖残基的 *N*-乙酰葡萄糖氨。在粗面内质网中，它被共价连接到跨膜蛋白上，然后在高尔基体中加工和修饰。

根茎轴(root-shoot axis)：植物根与茎之间的轴。大多数植物是沿着该轴生长的。

功能获得性突变(gain of function mutation)：使得正常基因活性增加的突变。有时所获得的是一些异常的特征。这有时但不一定与显性表型的产生有关。

供体区室(donor compartment)：出芽膜运输囊泡，将物质运输到指定的受体区室。

共翻译转运(cotranslational translocation)：蛋白一边合成，一边跨膜转移。通常限于形容核糖体结合在通道上的情形，因此这种运输仅见于内质网。

共生(commensal)：两有机体共同存在，一种受益，而另一种不受其影响。

共生(symbiosis)：两物种间及其亲密的关系，包括偏利、互利、寄生。

共质体(symplast)：植物中由胞间连丝连接而形成的细胞群体。

古细菌(Archaea)：在细胞壁的化学组成、核糖体 RNA、脂质以及一些酶类方面不同于真细菌的原核生物。这种原核生物包括生活在盐环境中的嗜盐菌，生活在无氧环境中的甲烷菌和生活在热酸性环境中的嗜酸嗜热菌。

固着生物(sessile organism)：依附在某种基质上不能自由移动的有机体。

寡糖转移酶(oligosaccharyltransferase)(OST)：内质网膜中的多亚基复合体，当蛋白进入内质网后，它催化糖基转移到蛋白上。

冠 (corona)：当动粒接触微管之前，从其表面向外发出的薄的浓密纤维结构。冠上包含很多微管依赖马达蛋白和其他蛋白，参与微管与动粒的连接。

光面内质网(smooth endoplasmic reticulum)：没有附着核糖体的内质网，参与脂质合成。

光异构化(photosiomerization)：化合物吸收光后自一种异构体变为另一种异构体(异构体是一种化合物的两种或更多样的形式，相同位置的原子以不同方式排列)。

过氧化物酶体基质(peroxisomal matrix)：过氧化物酶体的内空间。

合胞体(syncytium)：一个具有多个细胞核的细胞。

核被膜(nuclear envelope)：由两层膜组成(内、外核膜)，是核和胞质之间的分界。在核膜以下是由中间纤维组成的网格(核纤层)，核纤层与核内膜相连。核被膜上有核孔，核孔是核内外膜融合的区域。核外膜与粗面内质网膜相连。

核定位信号(nuclear localization signal)：(通常是短氨基酸序列)与核输入蛋白相互作用的蛋白结构域，使得蛋白被运输到细胞核。

核分裂(karyokinesi)：已复制的染色体均等分离形成两个子核的过程。有丝分裂包括核分裂和质分裂。

核基质(nuclear matrix)：当细胞核被处理去除所有的可溶性蛋白，脂类以及几乎所有的 DNA 时所能观察到的纤维网络。它可能维持细胞核的结构和组织，但对其是否存在仍然有争议。

核基质结合区(matrix attachment region)(MAR)：DNA 上与核基质结合的区域，也称为核骨架结合区（SAR）。

核孔蛋白(nucleoporin)：原指与抑制性凝集素结合的核孔复合体的成分，现在指核孔复合体的所有多肽成分。

核孔复合体(nuclear pore complex)：穿过核被膜的一种大的蛋白复合体，提供核和胞质间分子双向运输的通道。

核膜间隙(nuclear envelope lumen)：核内膜和核外膜之间的空间，与内质网腔相通。

核内不均一核糖核蛋白颗粒(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle)：核内不均一 RNA（hnRNA）的核糖核蛋白形式，由 hnRNA 与蛋白复合而成，简称 hnRNP。因为前体 mRNA 直到加工完后才向外运输，因此 hnRNP 仅存在于细胞核中。

核内膜(inner nuclear membrane)：位于核被膜靠核一侧的膜。核内膜与染色质和核纤层相互作用。

核配合(karyogamy)：两酵母细胞配对过程中核的融合。

核仁(nucleolus)：细胞核中产生核糖体的分散区域，也是一些额外的核功能发生的场所。

核输出信号(nuclear export signal)(NES)：(通常是短氨基酸序列)与核输出蛋白相互作用的蛋白结构域，使蛋白从核运输到细胞质。

核外膜(outer nuclear membrane)：核被膜的外层，与粗面内质网膜相连。

核纤层(nuclear lamina)：在核被膜的核质面所形成的有组织的蛋白层，由三种相关的中间纤维蛋白组成，称为核纤层蛋白。

核小体(nucleosome)：染色质的基本结构单位，由约 200bp 的 DNA 和八聚体组蛋白组成。

核小体定位(nuclesome positioning)：核小体定位在明确的 DNA 序列，而不是随机的。

核心组蛋白(core histone)：构成核小体核心颗粒的四种组蛋白(H2A、H2B、H3、

H4）。

核质(nucleoplasm)：核的内含物，除了核仁之外。

互补(complementation)：一个基因提供一种产物将突变型转化为野生型的能力。

互补群(complementation group)：在反式配对重组检验中，一系列不能互补的突变，表示一个遗传单位。

互惠关系(mutualistic relationship)：双方都受益的共生关系。

化学计量(stoichiometry)：化学反应中反应物和产物量之间的关系。

化学渗透(chemiosmosis)：利用跨膜氢离子梯度催化一种细胞过程的一种机制，如 ATP 的合成。

坏死(necrosis)：当细胞受损时所发生的一种死亡，细胞膨胀然后破裂，引起周围区域产生炎症。

环状片层(annulate lamellae)：位于胞质中，由核膜堆叠而成，包含核孔复合体。可能是过量核孔复合体的储藏位点。

回补(rescue)：微管动力学不稳定性模型过程中，延伸和缩短之间的转化过程。在遗传学中，回补突变意味着恢复野生型。

回收信号(retrieval signal)：一种类型的分选信号，当一种蛋白被不经意地运输到另一个区室，便通过其回收信号将其召回到行使正常功能的区室。

肌动蛋白(actin)：在真核细胞中表达的一种蛋白，能形成微丝参与某些类型的细胞运动。

肌动蛋白单体结合蛋白(actin monomer-binding protein)：在微丝中优先与肌动蛋白单体结合而不是与肌动蛋白亚单位结合，通过控制可聚合的游离肌动蛋白亚单位的浓度从而调节微丝的延长速率。胸腺素 β4 和 G 肌动蛋白结合蛋白是后生动物细胞中两种主要的肌动蛋白单体结合蛋白。

肌动蛋白交联蛋白(actin crosslinking protein)：使肌动蛋白交联成束状或网状结构。这些蛋白可以根据它们的肌动蛋白结合结构域而分为三类。

肌动蛋白束(actin bundle)：由肌动蛋白纤维以平行或反平行的方式排列而成，存在于伪足、纤毛等细胞结构中。

肌动蛋白网络(actin network)：由肌动蛋白纤维交联成的网状结构，存在于细胞皮层和伪足。

肌动蛋白纤维(actin filament)：由肌动蛋白亚单位组成的双链螺旋纤维。它是细胞骨架的三种主要组成成分之一，参与细胞运动和收缩。

肌球蛋白的负载比(duty ratio)：指 ATPase 循环过程中肌球蛋白头部接触肌动蛋白微丝的总时间。低负载比肌球蛋白依附微丝的时间短，而高负载比肌球蛋白大部分时间都依附在微丝上。

肌小节(sarcomere)：横纹肌原纤维的重复单位，参与肌肉收缩。由相互交错的厚的两极肌球蛋白纤维和薄的肌动蛋白纤维以及其他蛋白组成。两个 Z 轴的位置决定一个肌小节。

肌质网(sarcoplasmic reticulum)（SR)：骨骼肌和心肌细胞中特化的用于储存和释放钙的一种光面内质网。SR 中钙的释放起始了肌肉收缩。

基底面(basal surface)：极性细胞面向胞外基质的一面。与细胞的顶面相对，而与基膜相连。

基膜(basal lamina)：由细胞外基质蛋白组成的薄的片层，结合在上皮细胞或内皮细胞层的基底面，从而将其与其他组织分开，也存在于神经肌肉结合点。

基体(basal body)：位于真核细胞纤毛或鞭毛的基部，由微管和其他蛋白组成的短的圆柱状排列。具有类似于微管组织中心的作用，组织微管装配成轴丝从而形成纤毛或鞭毛的核心。

基质(stroma)：叶绿体的内部空间，含有大量参与光合作用的酶，也指器官的支持连接组织。

基质金属蛋白酶：一种能消化细胞外基质蛋白的酶类。

激酶(kinase)：催化磷酸基团从一个底物转移到另一个底物的酶。

激酶组(kinome)：有机体基因组中编码的蛋白激酶总体。

极化细胞(polarized cell)：具有两个或以上不同功能的膜区域的细胞，如上皮细胞的顶部和基膜，神经细胞的细胞体和轴突。

剂量补偿(dosage compensation)：一种性别存在两条 X 染色体而另一种性别仅存在一条 X 染色体之间差异的补偿机制。

寄生关系(parasitic relationship)：一种物种(寄生虫)以牺牲宿主为代价而自身受益的一种关系。

加帽蛋白(capping protein)：结合在肌动蛋白微丝端点的一种蛋白，减慢微丝延长。这种蛋白帮助控制细胞中微丝的长度。

间带 (interband)：多线染色体中位于带之间相对较分散的区域。

间接末端标记(indirect end labeling)：一种检验 DNA 组织结构的技术，通过在一特异位点产生一个缺口，鉴定包含与该缺口一侧相邻的序列的所有片段。它反应了 DNA 中从该缺口到下一个断裂之间的距离。

间隙连接(gap junction)：允许小的可溶性分子在相邻细胞之间直接转移的细胞-细胞连接。

间隙连接蛋白(connexin)：一种组成间隙连接的蛋白，6 个间隙连接蛋白组成一个半间隙连接通道。

间隙连接通道(gap junction channel)：间隙连接的结构基础。每个细胞构建半个通道，两个半通道在胞外空间连接在一起形成间隙连接。

兼性异染色质(facultatice heterochromatin)：指存在于活性拷贝中的惰性状态序列，例如雌性中的一条 X 染色体。

减数分裂(meiosis)：两次连续分裂产生四个子细胞，使得细胞染色体数从 4n 减为 1n (单倍体)。这些细胞可能发育成熟为动物中的性细胞(精子和卵子)或植物中的孢子。

减数分裂成熟(meiotic maturation)：当胞内信号诱导卵母细胞从减数分裂Ⅰ前期的阻滞状态中出来时，便进入减数分裂为受精做准备。

检验点(checkpoint)：作为对一些特异差错或条件的反应，从而使细胞周期延迟或停滞的生化途径。

胶原(collagen)：大多数动物组织的胞外基质的主要蛋白成分。

接合素(adaptin)：组成胞浆接头复合体的亚单位，调节网格蛋白有被小泡的形成。有许多类型的接合素亚单位。

接头蛋白(adaptor protein)：连接信号分子从而调节对胞外信号的反应，可能由两个或更多相互作用的结构域或者互补识别位点组成。

接头复合体(adaptor complex)：与跨膜蛋白的胞质尾部信号结合，从而招募网格蛋白分子到装配部位。不同部位由不同的接头复合体行使功能。每一个接头复合体由四个不同的亚单位组成。

拮抗剂(antagonist)：非活化性配体，占据受体上的结合位点从而竞争性抑制活化配体的结合。

结合(conjuagtion)：两细胞相互接触并交换遗传物质的过程。在细菌中，DNA从供体细胞转移到受体细胞。在原生动物中，DNA从每一个细胞传递到其他细胞。

紧密连接：细胞之间阻止大多数分子扩散的胞间连接方式。

局部连接(focal adhesion)：一种由局部黏附复合体而来的大的蛋白复合体，与肌动蛋白应力纤维紧密相连。局部黏附蛋白起始胞内信号途径对细胞与基质的相互作用做出应答。

局部黏附复合体(focal complex)：位于细胞与细胞外基质相互作用点，由整合素、细胞骨架和集中在细胞膜的信号蛋白组成。

巨噬细胞(macrophage)：一种能够穿越组织，吞食碎片和外源物质如细菌的吞噬细胞，可能参与T淋巴细胞的抗原提呈。

卡侯氏体(Cajal body)：又称缠卷体，一种亚核结构，因coilin蛋白的存在而得名，还包括其他蛋白以及RNA分子，可能是snRNA和snoRNA装配的位点，为RNA的加工做准备。

克隆性演替(clonal succession)：某组织或细胞中之前起支配作用的一个细胞克隆过度生长。

克隆性增殖 (clonal expansion)：从一单个母细胞不断增殖。

肯尼迪途径(Kennedy pathway)：从水溶性前体产生磷脂的一系列反应。因为它包括磷脂首先整合入膜的反应，所以肯尼迪途径是细胞膜扩张所必需的。

孔道(channel pore)：由通道蛋白组成，允许离子和可溶性分子通过。有时指离子传导或离子渗透途径。

跨膜结构域(transmembrane domain)：蛋白中跨越脂质双分子层的部分，它是疏水的，通常包含大约20氨基酸组成的α螺旋，也称为跨膜区。

类核(nucleoid)：原核细胞中包含基因组的结构，其中DNA与蛋白结合，但不被膜包围。

离子通道(ion channel)：选择性地允许一种或多种离子通过的跨膜蛋白。离子穿过时通过通道的中央水孔。

连接复合体(junctional complex)：位于相邻表皮细胞或内皮细胞平行表面的细胞-细胞连接的集合。这些连接主要控制细胞之间的渗透性并赋予细胞层结构稳定性。

连接小体(connexon)：间隙连接半通道的另一个名称。

良性肿瘤(benign tumor)：非侵袭性的肿瘤，因而不会扩散到身体的其他部位。

临界浓度(critical concentration)：在一聚合反应中，保持溶解稳定状态的亚单位(如肌动蛋白或微管蛋白二聚体)的总浓度。单体浓度必须高于临界浓度才能形成多聚体。

磷酸化(phosphorylation)：分子上引入磷酸基团。

磷酸酶(phosphatase)：通过水解去除底物磷酸基团的一种酶。

磷脂酰肌醇(phosphoinositide)：甘油酯磷脂酰肌醇的一种衍生物，在肌醇环上磷酸化。

硫酸肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan)：蛋白聚糖的一种，主要依附在细胞表面。它们主要作为细胞外基质蛋白和其他细胞受体的辅助受体。

门控(gating)：控制分子通过的通道蛋白的调节性开和关。

酶原(zymogen)：非活化的酶前体。

免疫球蛋白结构域(immunoglobulin domain)：抗体和其他免疫球蛋白超家族成员中的特征性结构域，由两个β片层组成，通过二硫键相连。

膜泵(membrane pump)：利用能量(如 ATP 水解)将可溶性分子逆电化学梯度从膜的一侧运输到另一侧的一类蛋白。

膜蛋白整合(integration)：蛋白的非极性跨膜区插入到脂双层使其成为跨膜蛋白的过程。

膜电位(membrane potential)：跨越细胞膜两侧的电位差(电压)。

膜复极化(repolarization)：膜电位恢复到其静息值的动作电位状态。

膜间隙(intermembrane space)：线粒体或叶绿体内外膜之间的空间。

末期(telophase)：有丝分裂的最后一个时期，开始于染色体到达纺锤体的两极，结束于两子核的核膜形成。

木质部(xylem)：植物中运输水和通过根吸收的营养物质到地上部分的管状成分，由长而薄的管组成，贯穿于植物的上下，水在从叶片的蒸发作用的驱动下通过毛细管作用通过每一个管。

内分泌信号(endocrine signaling)：信号分子，如激素，从分泌细胞排出随血流作用于远处的细胞。

内共生(endosymbiosis)：一种有机体生活在另一种有机体细胞内的共生关系。通常发生在当一个细胞捕获另一个细胞时，第二个细胞整合到第一个细胞。

内共生理论(endosymbiotic theory)：假说认为叶绿体和线粒体起源于共生在自由生活的单细胞有机体中的原核生物。

内吞途径(endocytic pathway)：从细胞膜通过早内体再到溶酶体的途径。物质从胞外基质通过这种途径内化。

内吞作用(endcytosis)：细胞从周围环境内化小分子和颗粒的过程。内吞作用具有多种形式，都包括从胞膜形成膜囊泡的过程。

内陷(invagination)：发育过程中细胞被折叠形成的凹槽，或指内吞过程中形成的网格蛋白被膜小窝。

内向整流(inward rectification)：离子通道引导的向内流量多于向外流量。

内质网(endoplasmic reticulum)：参与脂类、膜蛋白和分泌蛋白合成的一种细胞器。它是从核膜外层向胞质延伸的一个单一区室，有粗面内质网和滑面内质网之分。它是胞内的钙库。在心脏横纹肌细胞和骨骼肌中，通常指具有特化结构和功能的肌质网。

内质网相关性降解(ER-associated degradation)：在内质网中所发生的蛋白质的降解。通

常指一种蛋白反向运输出内质网，紧接着在胞质溶胶中降解。在内质网腔中，至今没有发现蛋白酶。

囊泡(vesicle)：细胞内由膜包裹的小体，从一个细胞器的膜出芽产生，常与另一种细胞器膜融合。

囊泡调节性运输(vesicle mediated transport)：细胞区室间运输的一种主要机制，包括从一个区室出芽产生膜包裹的囊泡以及与另一个区室融合。

囊性纤维化(cystic fibrosis)：一种潜在的人类致死疾病，以分泌过量的高黏度的黏液为特征，常见于肺或其他外分泌器官。囊性纤维化是由 CFTR(囊性纤维气导调节器)基因突变引起的，该基因编码一种参与离子运输的跨膜蛋白。

逆行转运 (retrograde translocation)：蛋白质从内质网腔向胞质溶胶运输，使得错误折叠或损伤的蛋白质被蛋白酶体降解，也叫反向转运或脱位转运。

黏合素(cohesin)：使姐妹染色单体保持在一起的蛋白复合体，直到后期，包含两种 SMC 蛋白。

鸟苷酸环化酶(guanylyl cyclase)：催化 GTP 转化为第二信使 3，5-环-GMP 和焦磷酸的一种酶。

凝集素(lectin)：选择性结合特异性糖的蛋白质，通常与糖蛋白的糖基结合。

浓缩素(condensin)：结合在染色体上的一种复合体的蛋白组分，在有丝分裂和减数分裂过程中使染色体浓缩。浓缩复合体包含 SMC 蛋白家族成员。

旁分泌信号转导(paracrine signaling)：相邻细胞之间的信号转导。

胚系(germline)：由生殖细胞(卵或精子)组成，作为遗传物质从一个有机体转移到下一代的载体。

配体(ligand)：一种非共价地结合到某种蛋白质上的分子，通常指结合并激活一种受体的胞外分子，能引起胞内效应。

配体门控通道(ligand-gated ion channel)：当配体结合时，选择性地允许某种类型的离子通过膜的一种膜蛋白。

膨压(turgor pressure)：植物细胞内由于细胞内外渗透压不平衡导致形成的压力，使得水进入液泡。植物生长过程中，膨压使细胞扩张膨胀。

起点 (origin)：DNA 序列的复制起始位点。

起点(START)：G_1 期中，酵母细胞进入分裂的点。在其他有机体中，该点成为限制点。

气孔(stomata)：位于叶子底面的孔，允许其内外气体的交换，从而发生光合作用。每一个气孔由一小部分细胞准确排列而成，能够随细胞的膨胀变化而开关。

前胶原(procollagen)：一种胶原蛋白形式，在氨基端和羧基端均含有防止聚合的氨基酸。

前期(prophase)：有丝分裂的一个时期，染色质浓缩而形成核内清晰可见的结构。前期结束后，核膜崩解，而进入前中期。

前体蛋白(preprotein)：将要被运输进入某一细胞器或将要从细菌分泌的蛋白，直到其信号序列被移除。

前质体(proplastid)：植物细胞中的一种小的膜包绕的细胞器，能够形成几种不同形式的质体。

前中期(prometaphase)：有丝分裂纺锤体形成的时期，开始于核膜崩解，染色体开始能够与微管相互作用，结束于所有染色体都与纺锤体接触而排列在其中央。

嵌合体生物(mosaic organism)：由不同基因型细胞组成的有机体。

腔(lumen)：被膜包裹的区室（如内质网或高尔基体）的内部。

桥粒(desmosome)：将相邻细胞连接在一起。它们由与中间纤维相连的膜蛋白组成。

亲和力调变：改变参与细胞连接的受体数量从而改变细胞黏附力。

亲和修饰(affinity modulation)：改变单个受体的结合力从而改变细胞黏附能力。

巯基介导的驻留 (thiol-mediated retention)：内质网中的一种质量控制机制，如果蛋白没有形成正确的分子间二硫键，将被保留在内质网。

区室(compartment)：一个膜包围的空间。

驱动蛋白(kinesin)：一个大的分子马达家族，在它们的马达区具有序列同源性。大多数驱动蛋白向微管的正极移动。

趋化性(chemotaxis)：有机体向或者远离其环境中一定化学物质运动的特性。

趋向(tropism)：感染过程中，病毒或者微生物对宿主细胞(或组织、物种)的特异性。

去极化(depolarization)：当一个细胞的膜电位增加至超过它的静息电位时即发生去极化，如动作电位产生的过程。此时，细胞内负电荷减少。

去乙酰化酶(deacetylase)：从蛋白质上去掉乙酰基的一种酶。

全能性细胞(totipotent cell)：有机体内能够分化成任何类型细胞并且能产生整个有机体的一种细胞。

缺氧症(anoxia)：缺乏氧气产生的症状。

(局部)缺血(Ischemia)：到达组织的氧流缺乏，通常是由血管堵塞引起的。

群体效应(quorum sensing)：细菌通过信号系统控制其群体密度。

染色单体(chromatid)：染色体经过复制的拷贝，通常指细胞分裂过程中它们分离之前的每一个拷贝。

染色粒(chromomere)：在一定条件下，染色体上清晰可见的浓密染色颗粒，尤其在减数分裂早期，一条染色体可能呈现出许多染色粒。

染色体(chromosome)：载有许多基因的基因组离散性单位。每条染色体由一条非常长的双链 DNA 和相当量的蛋白质组成。它仅在细胞分裂过程中作为一种形态实体清晰可见。

染色体骨架(chromosome scaffold)：当染色体被去除组蛋白后，所得到的形似姐妹染色单体对的蛋白结构。

染色体过客蛋白(chromosomal passenger protein)：位于每条染色体着丝粒的一种蛋白，当后期开始，它定位到两组正在分离的染色体之间延伸的微管上。染色体过客蛋白是动粒正确接触有丝分裂纺锤体所必需的，并且在胞质分裂中起作用。

染色体间区域(interchromosomal domain)：细胞核中不包含染色质的区域。

染色体结构维持蛋白 (structural maintenance of chromosome)：一种包含整合素和浓缩素的蛋白复合体，前者将姐妹染色单体保持在一起，后者参与染色体凝集。

染色体结构域(domain)：一个染色体的结构域可能指一个分散的结构实体，此区域内超螺旋与其他结构域相互独立，也可指包括对 DNAase Ⅰ 酶降解高度敏感的已表达基

因的延伸区域。

染色体区域(chromosome domain)：被单个染色体所占据的核区。

染色体驱动蛋白(chromokinesin)：分子马达驱动蛋白家族成员，依附在有丝分裂染色体的臂上。

染色体易位(chromosome translocation)：染色体的一种重排，一条染色体的一部分因断裂或异常重组而分离，然后取代另一条染色体(通常是非同源染色体)的相应部位。

染色体中心(chromocenter)：来自不同染色体的异染色质的聚集。

染色质(chromatin)：真核细胞周期间期，核DNA及其相关蛋白的形态。

染色质重塑(chromatin remodeling)：伴随基因转录激活所发生的能量依赖性的核小体的取代或重组。

热动力学控制(thermodynamic control)：当产物的组成由系统的平衡热动力学决定时，该反应即受热动力学控制，形成热力学更稳定的产物。

溶酶体(lysosome)：含有大量水解酶的一种细胞器，具有一个酸性的内环境。主要功能是负责内吞物质的降解。

肉瘤(sarcoma)：源于中胚层细胞(通常为连接组织谱系)的肿瘤。

入侵(intravasation)：原位肿瘤细胞进入血液和淋巴管。

三联体骨架(triskelion)：网格蛋白包被的功能单位，是一种" 三腿" 结构，每条腿由一条网格蛋白重链和一条网格蛋白轻链组成。

色素母细胞(chromoplast)：一种积累色素的质体。

上皮细胞(epithelium)：极化的细胞层，有一层或更多层，线性排列在体腔或外表面。上皮细胞具有一基膜和顶面。其功能涉及分泌、吸收和跨细胞运输。

神经外胚层(neuroectoderm)：产生中央和外周神经系统的早期胚胎部分。

神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule)：一种仅存于神经细胞的细胞-细胞连接处的细胞表面受体。

渗透(osmosis)：水通过半透膜的过程，如细胞膜。水流被膜两侧可溶性物质的浓度差所驱动。

渗透压(osmotic pressure)：当溶液通过膜与纯水隔离时所具有的吸水能力。

生长因子(growth factor)：是一种配基(通常是小分子多肽)，通过激活其受体(通常在质膜上)从而刺激靶细胞生长。生长因子通常被分离作为血清的成分从而使细胞能够在培养基中生长。

生物膜(biofilm)：由细胞分泌的胞外多糖基质包裹的许多原核细胞组成的结构。生物膜黏附在许多表面结构上。

生殖细胞(germ cell)：性细胞或由减数分裂产生的配子细胞。

失巢凋亡(anoikis)：当黏附细胞脱离它们的底物时发生的凋亡。

噬菌体(bacteriophage)：感染细菌的病毒。

收容区室 (acceptor compartment)：通过与载有物质的膜运输囊泡融合，接收来自一个或更多的区室的物质。

受体(receptor)：一种膜蛋白，在胞外结构域与配体结合，从而改变胞内结构域的活性。也有一种核受体，作为转录因子，能够被如固醇或其他小分子配体激活。

受体蛋白激酶(receptor protein kinase)：一类跨膜蛋白，能够磷酸化它们的胞内底物从而改变其靶蛋白的功能。

受体调节的胞吞作用(receptor-mediated endocytosis)：可溶性大分子与细胞表面受体结合然后内化的过程。

输出蛋白(exportin)：细胞核中的一种运输受体，与底物和Ran-GTP结合，形成三聚体复合体，然后穿过核膜进入细胞质，在胞质中，GTP水解导致底物的释放。

输入蛋白(importin)：位于胞质中的一种运输受体，在胞质中与底物结合，然后将其运输到细胞核中，与RanGTP结合，从而导致底物的释放。

衰老(senescence)：体外长期培养的细胞，经过多次增殖后，失去分裂能力的过程。

双极粗肌丝(bipolar thick filament)：由肌球蛋白Ⅱ装配而成，在肌肉收缩中起重要作用。粗肌丝在肌细胞肌小节中与肌动蛋白细肌丝相互交错。肌球蛋白Ⅱ彼此首尾相连，肌球蛋白自微丝的两端延伸，在肌肉收缩过程中牵拉细肌丝。

双轴取向(bi-oriented)：当染色体的两动粒依附到有丝分裂纺锤体的两极时所呈现的状态。当进入有丝分裂后期之前，细胞的所有染色体必须是双轴取向。

双组分信号系统(two-component signaling system)：包含被一个信号分子调节的组氨酸激酶结构域或亚单位，以及一个含有可磷酸化天冬氨酸残基的反应调节亚基。

水合层(hydration)：溶液中由于离子电荷的作用而形成的包裹在离子周围的水分子层。

水通道蛋白(aquaporin)：一种能够转运水分子或其他分子通过细胞膜的跨膜通道蛋白。

顺面高尔基网状结构(cis-Golgi network)：高尔基装置的顺面或进入面，是相互连接的小管组成的网状结构。

顺向成熟(cisternal maturation)：一种已知的通过高尔基囊泡堆的物质运输机制的模型，也称为顺向迁移。在这个模型中，在顺面形成新的高尔基囊泡，然后在从顺面到中间再到反面酶成分不断变化的高尔基堆中向前移动。属于早期囊泡的酶通过逆向运输囊泡重新获取。

松弛蛋白(expansin)：通过取代植物细胞壁结构成分之间的氢键而使其松弛的一种蛋白，结果导致细胞壁松弛，从而使细胞扩张。

酸生长理论 (acid growth theory)：植物生长激素通过导致细胞分泌质子而刺激其膨胀。细胞外环境的酸化破坏相邻细胞间的纤维连接，使其分开，从而进一步使细胞膨胀。

踏车模型(catastrophe)：微管表现为动力学不稳定性，其装配和解聚过程类似于踏车，称为踏车模型。

踏车现象(treadmilling)：多聚体的一端的装配速率和另一端的解聚速率相等的状态，这样的亚基流动保持了纤维的恒定长度。

弹性蛋白(Elastin)：一种能对牵拉作出反应而延伸或收缩的细胞外基质蛋白。

糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白(glycosylphosphatidylinositol)：基于磷脂酰肌醇的一种磷脂。与一些蛋白质共价结合，从而将它们锚定在膜上。

糖基转移酶(glycosyltransferase)：催化糖基转移到蛋白多糖核心蛋白上的一类酶。

体细胞 (somatic cell)：一个有机体除了生殖细胞之外的所有细胞，其基因不能被传给后代。

体细胞突变(somatic mutation)：发生在体细胞内的突变，因此只影响该细胞的子代细

胞，不影响生殖细胞系，因而不遗传给后代有机体。

条件突变(conditional mutation)：在一定的条件下(自由状态)表现为野生型，而在其他条件下(受限状态)表现为突变型。

调节型分泌(regulated secretion)(调节型外排)：储存在分泌颗粒中的底物分子经触发而释放出细胞。

调整(rectification)：膜电压变化导致离子通道离子导电性能发生变化。

贴壁依赖性(anchorage dependence)：正常真核细胞必须黏附于某个固体表面才能培养。

同时性检测器(coincidence detector)：仅当两种不同刺激信号被同时接受时才做出反应的信号元件。

同向运输体(symporter)：同向运输两种不同的溶质穿过细胞膜的一种载体蛋白。两种物质的运输能够同时或有序进行，也称为共运输体。

同源适应性(homologous adaptation)：在一条信号转导通路中，仅仅影响起始受体的一种反馈调节形式。

同种结合(homophilic binding)：同类蛋白受体互相结合。

透明质酸(hyaluronan)：一种与蛋白聚糖相互作用的糖氨聚糖，但不与蛋白聚糖核心蛋白共价连接，在软骨里含量丰富。

突出端(pointed end)：肌动蛋白微丝缓慢延伸的一端。

吞噬(phagocytosis)：一种内吞作用，细胞内化诸如细菌的一些大颗粒。

唾液酸化的路易斯寡糖-X 抗原 [Sialyl Lewis (x)]：位于选择素配体上的唾液酸复合体排列，结合选择素受体。

外排途径(exocytic pathway)：从内质网经高尔基体到胞膜的运输途径。也称为分泌途径。

外渗(extravasation)：细胞从血管移出进入组织内部。

晚胞内体(late endosome)：参与内吞途径的一种细胞器。当早胞内体中的蛋白质循环到胞膜时便形成晚胞内体，比早胞内体更偏酸性，包含一些水解酶。

网格蛋白(clathrin)：与接头复合体相互作用形成一些来自细胞膜胞质面或反向高尔基体网状结构的囊泡的外被。网格蛋白由重链和轻链组成，它们形成三角架，然后在网格蛋白有被小泡形成过程中装配成多面体曲面网格。

危象(crisis)：培养的原代细胞由于端粒太短而不能复制其 DNA 的状态。大多数细胞发生凋亡，少数突变体通过永生化而生存，具有延伸和保持端粒 DNA 的能力。

微管(microtubule)：由微管蛋白组成的薄的中空纤维。微管帮助组织细胞内部结构并维持细胞的形状，有时作为许多物质的运输轨道。

微管相关蛋白(microtubule-associated protein)：与微管结合，从而影响它们的稳定性和组织的一类蛋白。

微管亚基流(microtubule subunit flux)：有丝分裂纺锤体微管的一种行为。微管亚单位总是加入微管正极而从负极脱落。在稳定状态时，微管蛋白亚单位表现为连续从微管的一极移向另一极，微管长度不变。

微管依赖性分子马达：(microtubule-dependent molecular motor)：通过水解 ATP 沿着微管一极移动的一类蛋白。它们沿着微管促进物质运输，并且在组织微管本身过程中发

挥着重要作用。

微管组织中心(microtubule-organizing center)(MTOC)：微管的起始合成区。动物细胞中，中心体是主要的微管组织中心。

微球菌核酸酶(micrococcal nuclease)：一种裂解 DNA 的内切核酸酶，在染色质上，它特异性裂解核小体之间的 DNA.

微纤丝 (microfibril)：植物中，由纤维素合成复合体聚合形成的大量葡萄糖链被氢键结合在一起形成极强的纤维，称为微纤维。

伪足(filopodia)：当细胞沿某表面爬行时，在细胞前进的边缘形成的薄的尖长的辐射状结构，其形状和刚性由相应部位的肌动蛋白纤维束促成。

未折叠蛋白反应(unfolded protein response)：当未折叠蛋白在内质网腔积累时，一种增加内质网内分子伴侣表达的胞内信号途径。

位置效应斑 (position effect variegation)：基因由于邻近异染色质而导致表达沉默。

位置信息(position information)：胚胎特殊部位的大分子的定位，定位本身可能是一种形式的遗传信息。

温度敏感突变(temperature sensitive mutation)：突变产生一基因产物(常为蛋白)能够在低温时行使功能，而在高温时完全没有功能。与之相反的是冷敏感性突变。

稳定期(stationary phase)：生长曲线经过对数生长期之后的平台期。此时细胞数目保持不变。

稳定状态(steady state)：反应物和产物不再随时间而发生变化的一种状态。

无着丝粒片段 (acentric fragment)：(由断裂产生的)缺少着丝粒的染色体片段，在细胞分裂时将会丢失。

息肉(polyp)：良性肿瘤或从器官(如结肠)黏液外膜侵入的肿瘤。

细胞-细胞连接(cel-cell junction)：将相邻细胞连接在一起的几种特化的蛋白结构。

细胞板(cell plate)：有丝分裂后将细胞一分为二的细胞壁的前体。首先在两核之间形成一个小的圆盘，然后从里到外渐渐生长，直到接触细胞膜。它的形成是由成膜体引导的。

细胞壁(cell wall)：包裹在一些细胞(如细菌、酵母、植物细胞)的胞膜外的刚性被层，由细胞所分泌的胞外分子组成。大多数动物细胞没有细胞壁。细菌的细胞壁主要由肽聚糖组成，它形成一个包被从而保护并支持细胞。植物细胞壁的主要成分是多聚纤维素，它们组成极强的纤维。

细胞骨架(cytoskeleton)：真核细胞的细胞质中结构性纤维丝的总称。与细胞的形状、机械强度以及细胞迁移相关。主要由微管、微丝和中间纤维组成。

细胞核(nucleus)：含有基因组 DNA 的细胞器。它被双层核膜所包围，是 DNA 复制、基因转录以及大多数 RNA 加工的场所。

细胞膜(cellular membrane)：主要由脂质双分子层组成。双分子层是非对称的，极性头部朝外，尾部指向中心。它具有侧向流动性，包含蛋白质，有选择通透作用。

细胞器(organelles)：真核细胞的细胞质中的亚细胞结构。大多数细胞器具有一个有限的膜。一个细胞器可能由一个或多个不同区室组成。

细胞迁移(cell motility)：由细胞骨架调节的细胞运动，包括胞内细胞器和大分子复合体

的运动以及整个细胞的运动。

细胞外基质(extracellular matrix)：多细胞有机体中细胞间隙之间的不溶性糖蛋白形成的相对刚性结构。这些糖蛋白与胞膜蛋白相连。

细胞因子 (cytokine)：通常由免疫细胞分泌的一种小分子多肽，能够调节靶细胞的功能。

细胞质(cytoplasm)：一个细胞的胞膜之内的成分。在真核细胞中，细胞质包括胞质溶胶和除核以外的细胞器。

细胞质膜(cytoplasmic membrane)：原核细胞的细胞质膜即胞质周围的膜(脂双层及其相关成分)，与真核细胞的胞膜类似。

细胞周期(cell cycle)：细胞准确地一分为二所经历的整个有序的时期。

细菌(bacteria)：缺乏膜包裹的细胞器的单细胞有机体。如没有典型的细胞核。

纤毛(cilium)：参与细胞运动的鞭子样结构。它从细胞表面向外延伸，由膜包裹的微管阵列组成。

纤毛(pilus)：原核细胞表面延伸的一种纤维附属物，调节与其他细胞的相互作用，由纤毛蛋白组成。在“接合”过程中，纤毛将 DNA 从一个细菌转移到另一个细菌。也称为菌毛。

纤维素(cellulose)：由许多葡萄糖线性多聚体组成的纤维，它是植物细胞壁的主要结构成分。

纤维素合成复合体(cellulose-synthesizing complexe)：植物细胞内的一种大复合体，它催化合成多种多聚葡萄糖链，然后使之集合形成一个纤维素纤维，再整合入细胞壁。

纤粘连蛋白(fibronectin)：存在于大多数动物组织中的一种细胞外基质蛋白。主要支持细胞黏附和迁移。

纤粘连蛋白重复(fibronectin repeat)：组成纤粘连蛋白的线性排列的重复结构单位。

线粒体基质(mitochondrial matrix)：线粒体内膜封闭的空间。

线粒体相关膜(mitochondrial-associated membrane)：与线粒体外膜邻近的内质网膜的特化区域，参与一些脂类的合成反应。

限制点(restriction point)：G_1 期，检验细胞能否进入分裂的一个点。在酵母中又称为 START。

协同运输器(antiporter)：能够同时反向跨膜运输两种或以上的不同溶质分子的一种载体蛋白，也称为交换器。

信号锚定序列(signal anchor sequence)：保持结合在一种蛋白上的信号序列，作为一种跨膜结构域发挥作用。

信号识别颗粒(signal recognition particle)：翻译过程中识别信号序列的核糖核蛋白复合体，引导核糖体到转移通道，不同生物的的信号识别颗粒可能具有不同的组成，但都包含相关蛋白和 RNA。

信号肽酶(signal peptidase)：内质网膜中的一种酶，在蛋白转运过程中特异地去除信号序列。类似的活性还存在于细菌、古细菌、真核细胞的细胞器，蛋白通过可移除的定位序列进入这些部位。信号肽酶是一种大的蛋白复合体。

信号序列(signal sequence)：蛋白上的一段短的区域，指导其进入内质网进行共翻译转

运。也常指分选信号。

信号转导(signal transduction)：细胞感受刺激或细胞所处状态后转化为胞内信号的过程。

兴奋收缩耦联(Excitation-contraction coupling)：肌纤维收缩对膜去极化作出反应的过程。收缩是受胞质中钙离子浓度变化所调节的。

星体微管 (astral microtubule)：从中心体周围放射出的呈辐射状对称的星体结构。星体微管通常指从有丝分裂纺锤体的每一极辐射出并指向染色体的微管 。

修复(repair)：损伤的DNA链能够通过修复合成而取代，即损坏的一条链被切除，一条新链合成将其取代。也能够通过重组而被修复，包含损伤的DNA链双螺旋区被来自基因组的另一拷贝的未损伤区域所取代。

旋转定位(rotational positioning)：描述组蛋白八聚体相对于双螺旋面的方向性，决定了DNA的哪一面暴露在核小体表面。

选择素(selectin)：仅仅表达在血管细胞的一种细胞-细胞黏着受体。

选择性过滤器(selectivity filter)：赋予一种离子以特异性的离子通道部位。

血管生成(angiogenesis)：新血管形成的过程。

血管生成切换(angiogenic switch)：肿瘤细胞突然获得刺激血管增生的能力。

循环胞内体(recycling endosome)：内吞受体的储存位点，极化膜内吞系统的分选站。

压力纤维(stress fiber)：由肌动蛋白、肌球蛋白和其他蛋白组成的有收缩性的束状结构，锚定在胞膜上的蛋白复合体上，参与细胞黏附。

芽孢(endospore)：细菌内形成的孢子，当母细胞裂解时被释放。

亚型(isoform)：一类具有高度结构和功能同源性的蛋白质，通常重名外加一特异数字或字母表示。

延伸(elongation)：大分子合成反应(如复制、转录、翻译)的一个阶段，核苷酸或多肽链因加入亚单位而延长。在聚合反应中，指亚单位附加到成核或纤维末端。

叶绿体(chloroplast)：一种植物细胞中独有的由膜包裹的细胞器。它包含光合作用所必需的许多蛋白，并且是光合作用起始事件发生的位点。

液泡(vacuoles)：通过吸水而膨胀来促进植物细胞生长的一种膜细胞器，大约占据植物细胞内部空间的90%。

液泡膜(tonoplast)：包绕植物细胞液泡的膜。

衣被(coatomer)：COPⅠ包被小泡上的被膜蛋白复合体，由7种蛋白组成。

遗传性皮肤病(genodermatosis)：由桥粒或半桥粒蛋白突变引起的一种遗传疾病。

异染色质(heterchromatin)：基因组高度浓缩的区域，复制晚，不转录。异染色质分为两类：组成性异染色质和兼性异染色质。

异嗜性结合(heterophilic adaptation)：不同蛋白受体互相结合。

异源适应性(heterologous adaptation)：在会聚型途径中，起始多种受体下游通路的一种反馈调控形式，从而调节起始受体及其他受体活性。

易位子(translocon)：蛋白通过脂质双分子层转运需要的一种膜整合蛋白，提供多肽成分跨膜转移的通道。

缢缩环(contractile ring)：有丝分裂末期动物细胞膜下形成的肌动蛋白和肌球蛋白环，

定位在有丝分裂纺锤体的中间，在胞质分裂过程中为细胞提供一分为二的动力。

营养生长期(vegetative phase)：细菌正常生长和分裂的时期。对于产孢子细菌来说，与孢子形成的孢子期相对。

永生化(immortalization)：真核细胞获得无限次分裂能力的过程。

有丝分裂(mitosis)：真核细胞通过分裂而复制自身的过程，使得子细胞含有与母细胞相同数目的遗传物质。有丝分裂过程中，复制的染色体分离，细胞核分裂。

有丝分裂后期(anaphase)：有丝分裂中每一个已复制染色体的两条染色单体分离，并移向纺锤体两极的时期。

有丝分裂后期 A (anaphase A)：每条染色单体向它所连接的极靠近。

有丝分裂后期 B (anaphase B)：两纺锤体极彼此分离。后期 B 也被称为纺锤体延伸期。

有丝分裂后期促进复合体(APC)：一种大的蛋白复合体，促进细胞周期从中期向后期转移。它能够使特异蛋白泛素化，从而使其被降解。

有丝分裂后细胞(postmitotic)：曾经分裂过但已失去分裂能力的细胞。

诱变剂(mutagen)：通过诱导 DNA 的结构或碱基序列发生变化而增加突变率的物质。

诱导相聚(induced proximity)：一种 caspase 激活的机制，两单体互相接近形成活化的二聚体。

原癌基因(proto-oncogene)：可能突变成为癌基因的正常基因。

原弹性蛋白(tropoelastin)：没有被赖氨酰氧化酶修饰或装配成弹性纤维的弹性蛋白，是弹性蛋白的前体。

原核细胞(prokaryote)：没有膜包绕细胞核的单细胞有机体。

原核细胞荚膜(capsule)：细胞外膜的多糖富集层。

原胶原(tropocollagen)：由组织成三螺旋的胶原蛋白组成，没有前胶原尾巴，是胶原纤维的基本单位。

原噬菌体(prophage)：噬菌体基因组共价整合到细菌染色体而成为其线性染色体的一部分或保持自主的质粒样环状 DNA。

原位杂交(*in situ* hybridization)（也称细胞学杂交）：使涂抹在显微玻片上的细胞 DNA 变性，然后加入放射性标记的单链 RNA 或 DNA 探针与其杂交，再进行放射自显影。

原位肿瘤(primary tumor)：癌症患者体内形成的初始肿瘤实体。

允许生长条件(permissive growth conditon)：允许条件致死突变菌株生存的条件。

运输囊泡(transport vesicle)：在胞吞和胞吐途径中，将物质从一个区室运输到另一个区室的小泡。

运输体(transporter)：将离子或小分子运输通过细胞膜的受体，在膜的一面与分子结合，而在另一面将其释放。

运输物(cargo)：从一个细胞区室运输到另一个区室的大分子，如 RNA、可溶性或膜蛋白、脂质。运输物可能包含一些决定它们定位的序列或修饰。某些运输物通过运输囊泡运载，而其他如在核质之间运输的则不是。

杂合性缺失(loss of heterozygosity)：一种将遗传位点从杂合状态转化为纯合状态的变化。

载体蛋白(carrier protein)：直接将可溶性分子从膜的一侧运输到另一侧。在此过程中，

该蛋白发生构象变化。载体蛋白可分为两种：运输蛋白和运输泵。

早内体(early endosomes)：内吞途径的首个区室，内化分子在其中降解。它们略偏酸性。在早内体中，内化分子被分选以循环到胞膜或被运输到晚期胞内体和溶酶体。

早前期带(preprophase band)：有丝分裂开始前，植物细胞皮层内形成的微管和肌动蛋白带，通常是连续的，并且围绕在细胞将要分裂的同一平面上。

增生(hyperplasia)：组织中细胞数量的异常增加，没有明显的单个细胞的形态异常。

粘连连接(adherens junction)：由与肌动蛋白纤维相连的膜蛋白组成，将相邻的细胞连接在一起。

胀泡(puff)：多线染色体带上与 RNA 合成相关的一些位点形成的膨胀的带区。

真核生物(eukaryote)：单细胞或多细胞有机体，每个细胞包含一个核。真核生物意即“真的核”。

整倍体(euploid)：具有完全正常的整套染色体的细胞或有机体。

整合素(整联蛋白)(integrin)：一种 αβ 异二聚体细胞表面蛋白家族，参与细胞黏附调节。某些整合素结合在细胞外基质蛋白上，而其他则与细胞表面的 ICAM 相互作用。整合素是最丰富的细胞外基质受体蛋白。某些整合素与其他细胞受体结合。

整合子(integron)：允许基因盒整合的一种遗传成分。一个基本的整合子由整合酶基因，整合靶位点以及促进整合基因表达的启动子组成。

支架蛋白(scaffolding protein)：结合信号转导通路的各种蛋白成分。

脂蛋白(lipoprotein)：由共价连接的蛋白和脂类组成，也可指脂质和蛋白连接成的颗粒。

质粒(plasmid)：染色体以外的环状 DNA，能够自我复制。

质量控制(quality control)：异常蛋白的鉴定、修复或者排除，常指内质网中蛋白质的生物合成。

质膜(plasma membrane)：限定每一个细胞边界的连续的膜。

质体(plastid)：植物细胞特有的一类由膜包绕的细胞器。不同类型的质体由共同的称为前质体的前体细胞器分化而来，但具有不同的功能。一个细胞内只有一种。叶绿体是最常见的质体。

质子动力势(proton motive force)：一些生物膜两侧的质子浓度存在差异，当质子通过膜从高浓度一侧向低浓度一侧移动时，产生质子驱动力，促进其他细胞生物学过程。

致癌基因(oncogene)：其产物能够使真核细胞发生转化的基因，使得细胞以类似于肿瘤细胞的方式生长。

致癌物(carcinogen)：增加细胞癌变频率的化学物质。

滞留信号(retention signal)：使蛋白定位到正确的膜的序列，阻止其离开该区室。例如，高尔基体常驻蛋白的跨膜区。

中板集合(congression)：有丝分裂纺锤体接触动粒和向赤道板移动时所表现的一系列运动。

中间纤维(intermediate filament)：真核细胞中遍布胞质的三种细胞骨架纤维之一。中间纤维是三种骨架中最坚硬的一种，它赋予组织以机械应力。

中期(metaphase)：减数分裂或有丝分裂中，所有染色体都排列在有丝分裂纺锤体两极

间赤道板上的时期。

中体(midbody)：有丝分裂中，在两分离的子核之间形成的一种大微管束及其相关蛋白组成的复合体。中体在胞质分裂时起着重要的作用。

中心纺锤体(central spindle)：有丝分裂过程中，由微管的正极和相关蛋白相互交错而成的结构。

中心粒(centriole)：动物细胞中的一种小型细胞器。每一个中心粒由九组微管组成管状。中心粒位于中心体中央，常成对存在。

中心粒基质(pericentriolar material)：中心粒周围由蛋白装配形成的结构，是中心体微管成核所在地。

中心体(centrosome)：动物细胞内的一个小细胞器，作为微管组织中心，形成有丝分裂纺锤体极。每个中心体由一对中心粒和其周围的大量蛋白质组成。

终末分化细胞(terminally differentiated cell)：通常不能够再继续分裂的特化细胞。

肿瘤(tumor)：异常生长的组织。

肿瘤抑制蛋白(tumor suppressor protein)：通常阻止细胞增殖或促进细胞死亡，当肿瘤抑制基因发生功能缺失突变或启动子被甲基化失活时可能发生癌症。

周期蛋白(cyclin)：与周期蛋白依赖性蛋白激酶结合并帮助激活其活性的一种蛋白。周期蛋白浓度随细胞周期而变化，在调节细胞周期进程中发挥重要作用。

周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase)：一种需要结合周期蛋白才能激活的激酶家族。大多数周期蛋白依赖性激酶参与细胞周期控制。

周质空间 (periplasmic space)：革兰氏阴性细菌细胞膜的内外膜之间的区域。

轴丝(axoneme)：由微管束和其他蛋白形成的纤毛或鞭毛的核心。

主动牵拉模式(active pulling model)：一种翻译后向内质网转移的模式，指的是 ATP 水解诱导 BiP 构象变化，从而通过运输通道牵拉底物进入内质网腔。

转胞吞作用(transcytosis)：极化细胞中，如神经细胞或上皮细胞，分子从一种类型的细胞膜区域运输到另一个区域。

转导(transduction)：噬菌体将细菌基因从一个细菌转移到另一个细菌。载有宿主基因的噬菌体称为转导噬菌体。转导也指真核细胞的序列被反转录病毒采集和转移。

转化(transformation)：细菌由于引入额外的 DNA 而获得新的遗传物质。

转录因子(transcription factor)：直接或间接调节 RNA 聚合酶起始特异启动子转录的蛋白，但其本身不是酶的组成成分，

转染 (transfection)：裸露的 DNA 或 RNA 引入真核细胞的过程，通常有磷酸钙共沉淀参与。

转移(metastasis)：肿瘤细胞从原位肿瘤迁移到体内其他位点，形成新的肿瘤细胞集落。

转运内质网(transitional endoplasmic reticulum)：位于内质网和高尔基体之间的光面内质网，是两细胞器之间蛋白转运的场所，有时称为内质网-高尔基体中间成分或 ER-GIC。

转运肽(transit peptide)：运输入叶绿体的蛋白的信号序列。

转座(transposition)：转座子在基因组中转移到一个新的位点。

着丝粒(centromere)：染色体的缢痕区，包含有丝分裂或减数分裂纺锤体的结合位点。

着丝粒由独特的 DNA 序列和蛋白质组成，没有在染色体的其他部位发现其存在。

自分泌信号(autocrine)：细胞对自身分泌的信号做出反应。

自磷酸化(autophosphorylation)：蛋白激酶被同种蛋白激酶分子催化而磷酸化。自磷酸化不一定发生在同一多肽链的催化位点上。例如，在一个二聚体中，每一个亚基可以相互磷酸化。

自身免疫性大疱性皮肤病(autoimmune bullous dermatosis)：病人产生一种抗桥粒或半桥粒内蛋白的自身抗体所引起的疾病。

自噬(autophagy)：一种非特异性降解胞内成分的机制，降解产物可作为细胞的营养物质。饥饿的细胞或受其他压力的细胞常发生自噬作用。

自我装配(self-assembly)：蛋白不需要其他成分(如伴侣分子)的参与，自身形成最终结构。也指分子碰撞彼此结合后，自发地形成某种生物结构。

自养(autotrophy)：能够利用无机物转化为有机物的能力。在光合作用过程中，植物利用光能将大气中的二氧化碳转化为更复杂的分子。

组成型分泌(constitutive secretion)：大分子以一种相对恒定的速率向细胞膜运输或分泌的过程。这些包括从反面高尔基体网状结构向胞膜外分泌的脂类，可溶性分子和膜蛋白，属于不受调控的外排过程。

组成型异染色质(constitutive heterochromatin)：描述永久非表达序列(通常为卫星 DNA)的惰性状态。

组蛋白(histone)：真核生物中保守的 DNA 结合蛋白，形成染色质的基本单位。由 H2A、H2B、H3、H4 形成一个八聚体核心，然后 DNA 盘绕其上形成一个核小体，H1 组蛋白为于核小体外部。

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase)：从组蛋白中去除乙酰基的酶，它们可能与转录抑制有关。

组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase)：通过引入乙酰基从而修饰组蛋白的酶，一些转录辅助因子具有乙酰转移酶活性。

组蛋白折叠(histone fold)：在所有四种核心组蛋白中发现的一种由三个 α 螺旋连接的两个环形的结构域。

作功冲击(powerstroke)：肌球蛋白产生动力的运动，作功冲击过程中，肌球蛋白的调节亚基杠杆臂发生大的旋转或构象变化。

桑建利　译

蛋白质数据库索引

图号	PDB号	引文
2.8, 2.9, 2.11, 2.12	1K4C	Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* v. 414 p. 43–48.
2.12. 2.13	1LNQ	Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and Mackinnon, R., 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* v. 417 p. 515–522.
2.23	1KPK	Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 2002. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 A reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* v. 415 p. 287–294.
2.24	1OTS	Dutzler, R., Campbell, E.B., and MacKinnon, R., 2003. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* v. 300 p. 108–112.
2.27, 2.28, 2.29	1J4N	Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., and Jap, B. K., 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* v. 414 p. 872–878.
2.39	1PV6	Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S., 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* v. 301 p. 610–615.
2.40	1PW4	Huang, Y., Lemieux, M. J., Song, J., Auer, M., and Wang, D. N., 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* v. 301 p. 616–620.
2.47	1ZCD	Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., and Michel, H., 2005. Structure of a Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* v. 435 p. 1197–1202.
2.50	1SU4 (replaced 1EUL)	Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H., 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* v. 405 p. 647–655.
2.50, 2.52	1IWO	Toyoshima, C., and Nomura, H., 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* v. 418 p. 605–611.
2.53	1QO1	Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E., 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* v. 286 p. 1700–1705.
2.59	1P7B	Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A., 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* v. 300 p. 1922–1926.
3.14	1RHZ	van den Berg, B., Clemons, Jr., W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A., 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* v. 427 p. 36–44.
8.2	1ATN	Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C., 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* v. 347 p. 37–44.
8.14	2BTF	Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., and Lindberg, U., 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* v. 365 p. 810–816.
8.15	1KBK	Rydberg, E. H., Li, C., Maurus, R., Overall, C. M., Brayer, G. D., and Withers, S. G., 2002. Mechanistic analyses of catalysis in human pancreatic alpha-amylase: detailed kinetic and structural studies of mutants of three conserved carboxylic acids. *Biochemistry* v. 41 p. 4492–4502.
8.29	2MYS	Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M., 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* v. 261 p. 50–58.
11.9	1B38	Brown, N. R., Noble, M. E., Lawrie, A. M., Morris, M. C., Tunnah, P., Divita, G., Johnson, L. N., and Endicott, J. A., 1999. Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 8746–8756.
11.9	1FIN	Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N .P., 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature* v. 376 p. 313–320.
11.15	1JSU	Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P., 1996. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* v. 382 p. 325–331.
11.25	1UMW	Elia, A., Rellos, P., Haire, L., Chao, J., Ivins, F., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L., Smerdon, S., and Yaffe, M., 2003. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* v. 115 p. 83.
12.6	1GQF	Riedl, S. J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G. S., and Bode, W., 2001. Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 14790–14795.
12.6	1I51	Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., Shi, Y., and Dataa, P., 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* v. 104 p. 769–780.
12.8	1DDF	Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W., 1996. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* v. 384 p. 638–641.
12.8	1E41	Berglund, H., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., Mcdonald, N. Q., and Driscoll, P. C., 2000. The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human Fadd death domain. *J. Mol. Biol.* v. 302 p. 171–188.
12.8	1CY5	Vaughn, D. E., Rodriguez, J., Lazebnik, Y., and Joshua-Tor, L., 1999. Crystal structure of Apaf-1 caspase recruitment domain: an alpha-helical Greek key fold for apoptotic signaling. *J. Mol. Biol.* v. 293 p. 439–447.
12.9	1I30	Heerding, D. A., Chan, G., DeWolf, W .E., Fosberry, A. P., Janson, C. A., Jaworski, D. D., McManus, E., Miller, W. H., Moore, T. D., Payne, D. J., Qiu, X., Rittenhouse, S. F., Slater-Radosti, C., Smith, W., Takata, D. T., Vaidya, K. S., Yuan, C. C., and Huffman, W. F., 2001. 1,4-Disubstituted imidazoles are potential antibacterial agents functioning as inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase (FabI). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v. 11 p. 2061–2065.
12.19	1PQ0	Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J. W., 2003. The structure of a Bcl-xl/Bim fragment complex: Implications for Bim function. *Immunity* v. 19 p. 341–352.
12.19	1F16	Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N., 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* v. 103 p. 645–654.
12.19	1DDB	McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J., and Cowburn, D., 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: A structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* v. 96 p. 625–634.

图号	PDB号	引文
13.11	1GUX	Lee, J. O., Russo, A. A., and Pavletich, N. P., 1998. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* v. 391 p. 859–865.
14.16	1CFD	Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B., and Bax, A., 1995. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* v. 2 p. 768–776.
14.16	1MXE	Clapperton, J. A., Martin, S. R., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., and Bayley, P. M., 2002. Structure of the complex of calmodulin with the target sequence of calmodulin-dependent protein kinase I: Studies of the kinase activation mechanism. *Biochemistry* v. 41 p. 14669–14679.
14.19	2BG9	Unwin, N., 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* v. 346 p. 967–989.
14.23	1F88	Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* v. 289 p. 739–745.
14.24	1GP2	Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R., 1995. The structure of the G protein heterotrimer Giα1β1γ2. *Cell* v. 83 p. 1047–1058.
14.31	1ERK	Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J., 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* v. 367 p. 704–711.
14.31	2ERK	Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J., 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* v. 90 p. 859–869.
14.37	1FMK	Xu, W., Harrison, S. C., and Eck, M .J., 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* v. 385 p. 595–602.
14.37	1Y57	Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., Manley, P. W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., and Meyer, T., 2005. The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure* v. 13 p. 861–871.
14.39	1JST	Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. P., 1996. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* v. 3 p. 696–700.

索　引